

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**ESTRUCTURA DEL ECTODOMINIO DE 4F2HC E  
IMPLICACIÓN DE 4F2HC EN TUMORIGÉNESIS: EFECTOS  
DEL BUTIRATO Y LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE  
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Angélica Santiago Gómez**

Bajo la dirección de los doctores

M<sup>a</sup> Antonia Lizarbe Iracheta  
Francisco Javier Turnay Abad

**Madrid, 2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**ESTRUCTURA DEL ECTODOMINIO DE 4F2hc E  
IMPLICACIÓN DE 4F2hc EN TUMORIGÉNESIS.  
EFECTOS DEL BUTIRATO Y LOS ÁCIDOS  
BILIARES SOBRE CÉLULAS DE  
ADENOCARCINOMA DE COLON**

**ANGÉLICA SANTIAGO GÓMEZ**

MADRID, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**ESTRUCTURA DEL ECTODOMINIO DE 4F2hc E  
IMPLICACIÓN DE 4F2hc EN TUMORIGÉNESIS.  
EFECTOS DEL BUTIRATO Y LOS ÁCIDOS  
BILIARES SOBRE CÉLULAS DE  
ADENOCARCINOMA DE COLON**

DIRECTORES: Dra. M<sup>a</sup> ANTONIA LIZARBE IRACHETA  
Dr. FRANCISCO JAVIER TURNAY ABAD

TESIS DOCTORAL

**ANGÉLICA SANTIAGO GÓMEZ**

MADRID, 2012

*«The state of mind which enables a man to do work of this kind is akin to that of the religious worshipper or the lover; the daily effort comes from no deliberate intention or program, but straight from the heart»*

**Einstein, 1918**  
(for Max Planck's 60<sup>th</sup> Birthday  
at Physical Society, Berlin)

*La presente tesis doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, bajo la dirección de la Dra. María Antonia Lizarbe y del Dr. Javier Turnay. A María Antonia quisiera agradecerle la oportunidad que me dio, antes de terminar la licenciatura, de incorporarme a su grupo como estudiante colaborador y, posteriormente, al permitirme continuar mis estudios de doctorado en su laboratorio. Además a ella junto a Javier y Nieves, quiero agradecerles su paciencia y dedicación durante estos años. Asimismo quisiera dar las gracias al Dr. José Gavilanes Franco por darme la oportunidad de incorporarme a este departamento.*

*A todos los compañeros con los que he compartido estos años en el laboratorio, especialmente a Emilio, que me enseñó a trabajar con células, a Juan con el que he trabajado codo con codo y a Sara Abián, a Jaime y a Noela por su amistad.*

*Asimismo agradezco al Dr. Rob Clarke que me abriera las puertas de su laboratorio en Manchester para adentrarme en el mundo de las células madre del cáncer, al que espero volver algún día. A todo Breast Biology y los amigos que hice fuera y dentro del Paterson.*

*Y por último, pero no menos importante, a mis amigos, a mi familia y, muy especialmente, a mis padres y a mi hermana, por ser un apoyo incondicional y creer siempre en mí. Sin vosotros no estaría hoy aquí.*

**SUMMARY**

4F2hc is a type-II glycoprotein that form covalently-bound heterodimers with several described light chains and whose main function is the transport of amino acids. Likewise, the heavy chain interacts with  $\beta$ -integrins mediating integrin-dependent events such as survival, proliferation, migration and even transformation. Its large C-terminal domain resembles  $\alpha$ -amylases structure, but lacking catalytic residues and thus enzymatic activity. In fact, this ectodomain contains the N-terminal domain A, a TIM barrel, connected by 6 residues in  $\alpha$ -helix to the C-terminal domain C, comprised of a  $\beta$ -sandwich. Spectroscopic/structural characterization of recombinant 4F2hc-ED shows that its structure in solution is quite similar to that of the crystal, being compact and thermally stable. Moreover, this ectodomain is unable to homodimerize by itself, remaining monomeric in solution. According to the data obtained, the folding/unfolding mechanism of 4F2hc-ED may occur following a 4-state model with 2 intermediate forms.

4F2hc is a ubiquitous protein whose overexpression is related to tumor development and progression. Stable silencing of 4F2hc in HeLa cells shows impaired *in vivo* tumorigenicity and an ineffective proliferative response to mitogens. Moreover, silenced cells present defects in integrin- (FAK, Akt and ERK1/2) and hypoxia-dependent signaling, reduced expression/activity of MMP-2 and increased degradation of  $\beta$ -catenin. Furthermore, cell motility is impaired after protein silencing, showing for the first time the involvement of 4F2hc in tumor invasion via facilitating cell motility. Therefore, 4F2hc participates in tumor progression favoring the first steps of epithelial-mesenchymal transition, by inhibiting  $\beta$ -catenin proteasomal degradation through Akt/GSK-3 $\beta$  signaling and enabling cell motility and neovascularization.

In addition, 4F2hc overexpression is irrespective of tumor tissue origin. Its association with  $\beta$ 1-integrin does not occur in lipid rafts, but may be in tetraspanin-enriched membrane domains. There is no clear correlation between 4F2hc protein levels and tumorigenicity activity or differentiation degree, although cells showing a more malignant phenotype present more complex glycosylation. 4F2hc silencing in tumorigenic BCS-TC2.BR2 and BCS-TC2.2 cells (the former more differentiated than the latter) gives rise to a delayed tumor growth rate.

Colonic epithelium is exposed to a wide range of agents which may affect its homeostasis. Among them, butyrate, a product of anaerobic bacterial fermentation of dietary fiber, regulates it controlling proliferation, differentiation and apoptosis of intestinal cells. Other cytotoxic agents usually present in colonic lumen are bile acids. Acquisition of resistance to these apoptotic/cytotoxic effects is crucial for the development of colorectal carcinogenesis. Studies were carried out using a non-tumorigenic human colon adenocarcinoma cell line sensitive to butyrate (BCS-TC2) and a cell subline resistant to its apoptotic effect (BCS-TC2.BR2). The latter is tumorigenic and present also resistance to metabolic, thermal and osmotic stress, and to other luminal components such as bile acids or LPS. Bile acids exert cytotoxic effects on BCS-TC2 cells triggering apoptosis by disruption of mitochondrial function. First, DCA and CDCA increase ROS generation by activating plasma membrane enzymes; this promotes mitochondrial transition permeability and subsequently caspase activation via apoptosome. Caspase-3 induces amplification of apoptosis by degradation of Bcl-2 with consequent activation of Bax, which generates additional mitochondrial permeabilization and malfunction. In both cell lines butyrate uptake is carried out by two different mechanisms: at high concentrations a butyrate/bicarbonate antiporter and at low concentrations, a H<sup>+</sup>/monocarboxylate cotransporter. The latter is energy dependent, activated by PKC $\delta$  and mediated by MCT1.

Butyrate mainly exerts its effects through inhibition of HDACs, regulating gene expression by controlling the acetylation status of histones and non-histone proteins, such as Smad2 in the regulation of butyrate-induced *MMP11* gene. Moreover, many signaling pathways are altered by HDAC inhibitors. Butyrate triggers a pro-survival early activation of Akt and ERK1/2 in both cell lines, which later on falls off as a consequence of apoptosis in BCS-TC2 cells, whereas BCS-TC2.BR2 maintain basal activation levels of these kinases. Moreover, HDAC inhibitors affect other signaling pathways such as JNK, HIF-1 dependent signaling and NF $\kappa$ B, among others. In addition, butyrate induces cell cycle arrest by transcriptional activation of *p21* (which is independent of JNK and p38 signaling). Furthermore, butyrate provokes double strand breaks as confirmed by  $\gamma$ H2AX expression in both cell lines, being delayed in BCS-TC2.BR2.

## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

<b>1.1. 4F2hc, CADENA PESADA DEL TRANSPORTADOR HETERODIMÉRICO DE AMINOÁCIDOS .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Estructura de la proteína 4F2hc .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2. Regulación de la expresión génica.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.3. Funciones de 4F2hc .....</b>	<b>10</b>
<i>Transportador de aminoácidos, poliaminas y hormonas tiroideas</i>	
<i>Modulación de integrinas</i>	
<i>Metabolismo energético</i>	
<i>Implicación en la respuesta inmune</i>	
<i>Desarrollo embrionario</i>	
<i>Fusión</i>	
<i>Proliferación y Transformación Maligna</i>	
<b>1.2. METALOPROTEINASAS DE MATRIZ .....</b>	<b>24</b>
<i>CD147/EMMPRIN, las MMP y cáncer</i>	
<b>1.3. EPITELIO COLÓNICO .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN CARCINOGENÉISIS</b>	
<b>1.4.1. Dieta .....</b>	<b>33</b>
<b>1.4.2. Componentes del lumen intestinal .....</b>	<b>34</b>
<i>Ácidos Biliares</i>	
<i>Butirato</i>	
<b>1.5. EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE HISTONA DESACETILASAS ..</b>	<b>38</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

<b>3.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL ECTODOMINIO DE 4F2hc</b>	
<b>3.1.1.- Cuantificación de la concentración de proteína .....</b>	<b>50</b>
<i>Análisis de aminoácidos</i>	
<i>Medidas de absorción en el UV</i>	
<i>Método de Bradford</i>	
<b>3.1.2. Espectroscopía de emisión de fluorescencia .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1.3. Entrecruzamiento .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2. TÉCNICAS GENERALES DE CULTIVO CELULAR</b>	
<b>3.2.1. Cultivo celular, subcultivos y criopreservación de células .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.2. Tratamiento de las células con distintos agentes .....</b>	<b>56</b>
<i>Inhibición de la glicosilación</i>	
<i>Inhibidores de histona desacetilasas</i>	



<i>Inhibidores/activadores de rutas de señalización</i>	
3.2.3. Obtención de extractos totales y extractos nucleares y citoplasmáticos .....	57
3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS GENERALES	
3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) .....	57
3.3.2. Transferencia e inmunodetección ( <i>Western blot</i> ) .....	58
3.4. SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE 4F2hc .....	62
3.4.1. Diseño y clonación del miRNA .....	62
3.4.2. Clonación en vectores lentivirales .....	63
3.4.3. Preparación de partículas lentivirales .....	64
<i>Producción de partículas lentivirales</i>	
<i>Purificación y concentración de lentivirus</i>	
3.4.4. Titulación de las partículas virales e infección .....	65
3.4.5. Transducción de las células .....	65
3.5. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN CELULAR	
3.5.1. Ensayos de adhesión celular .....	66
3.5.2. Ensayo de extensión celular .....	67
3.5.3. Ensayos de proliferación celular .....	68
3.6. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	68
3.7. INMUNOFLUORESCENCIA .....	69
3.8. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LÍQUIDO ASCÍTICO .....	69
3.9. INMUNOPRECIPITACIÓN .....	70
3.10. GRADIENTES DE SACAROSA .....	71
3.11. ENSAYOS DE INVASIÓN <i>IN VITRO</i> .....	71
3.12. ESTUDIOS DE TUMORIGENICIDAD <i>IN VIVO</i> .....	72
3.13. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	
3.13.1.- Valoración de la actividad de endoglicosidasas F/H .....	72
3.13.2.- Valoración de la actividad de metaloproteinasas y cuantificación de la actividad de MMP-2 .....	73
3.14. MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR: actividad de fosfatasa alcalina y expresión de dipeptidil peptidasa IV .....	75
3.15. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN Y DE LUCIFERASA .....	75
3.16. ARRAYS .....	76
<i>Array de tejidos</i>	
<i>Array de rutas de señalización</i>	
4. RESULTADOS	
4.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE 4F2hc .....	81
4.1.1. Estructura del ectodominio de 4F2hc .....	81

4.1.2. 4F2hc y tumorigénesis en células HeLa .....	94
4.1.3. 4F2hc y tumorigénesis en adenocarcinoma de colon .....	120
<i>Expresión de 4F2hc en tejidos tumorales</i>	
<i>Expresión de 4F2hc en células en cultivo</i>	
<b>4.2. EFECTOS DE COMPONENTES DEL LUMEN INTESTINAL SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON</b>	
4.2.1. Adquisición de resistencia a butirato .....	133
4.2.2. Transporte de butirato en células de adenocarcinoma de colon .....	135
4.2.3. Efectos del butirato sobre la regulación de la expresión génica .....	137
4.2.4. Apoptosis inducida por ácidos biliares en células de adenocarcinoma de colon .....	139
4.2.5. Efectos del butirato en la señalización celular en proliferación y diferenciación y en apoptosis .....	141
<b>5. DISCUSIÓN</b>	
5.1. ESTRUCTURA DEL ECTODOMINIO DE LA PROTEÍNA 4F2hc .....	155
5.2. PAPEL DE 4F2hc EN TUMORIGÉNESIS .....	159
5.3. EFECTOS DE COMPONENTES DEL LUMEN INTESTINAL SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON.....	170
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	181
<b>7. BIBLIOGRAFÍA...</b> .....	185
<b>8. ANEXOS.</b> .....	207

## ABREVIATURAS

4F2hc	cadena pesada de 4F2
4F2hc-ED	ectodominio de 4F2hc
4F2lc	cadena ligera de 4F2
AE	<i>Anion Exchanger</i>
AMPK	proteína quinasa activada por AMP
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
att	<i>Attachment Recognition Sites</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BRE	<i>Butyrate Response Element</i>
BSA	albúmina de suero bovino
CA	ácido cólico
CDCA	ácido quenodesoxicólico
CMV	citomegalovirus humano
Col	colágeno
CSC	<i>Cancer Stem Cell</i>
DCA	ácido desoxicólico
DMEM	medio Eagle modificado por Dubelcco
DMSO	dimetilsulfóxido
DSC	calorimetría diferencial de barrido
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
ECM	matriz extracelular
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EmGFP	<i>Emerald Green Fluorescence Protein</i>
EMMPRIN	<i>Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer</i>
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
ERK	quinasas reguladas extracelularmente
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAK	quinasa de adhesión focal
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FN	fibronectina
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
HA	hematoglutinina
HAT	histona acetiltransferasas
HDAC	histona desacetilasa
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HRP	peroxidasa de rábano
HSP	proteína de choque térmico
IFN- $\gamma$	interferón gamma
IHF	<i>Integration Host Factor</i>
JNK	<i>Jun amino-terminal Kinase</i>
LCA	ácido litocólico
LN	laminina
LPI	<i>Lysinuric Protein Intolerance</i>
LPS	lipopolisacárido bacteriano
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MCT	transportador de monocarboxilato
MDR	<i>MultiDrug Resistance</i>

## Abreviaturas

---

MES	ácido etanosulfónico 2-N-morfolino
MFI	intensidad de fluorescencia media
MGC	célula gigante multinucleada
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MMR	<i>MisMatch Repair</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor κB</i>
PAGE-SDS	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PE	ficoeritrina
PI3K	Fosfoinositol 3OH-quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RFU	unidades relativas de luciferasa
RNS	especies reactivas de nitrógeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
SAHA	<i>SuberoyAnilide Hydroxamic Acid</i>
SCFA	ácido graso de cadena corta
SDS	dodecilsulfato sódico
SLC	<i>Solute Carrier</i>
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TGF-β	<i>Tumor Growth Factor β</i>
TSA	Tricostatina A
UDCA	ácido ursodesoxicólico
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular

## 1. *Introducción*



## 1.1. 4F2hc, CADENA PESADA DEL TRANSPORTADOR HETERODIMÉRICO DE AMINOÁCIDOS

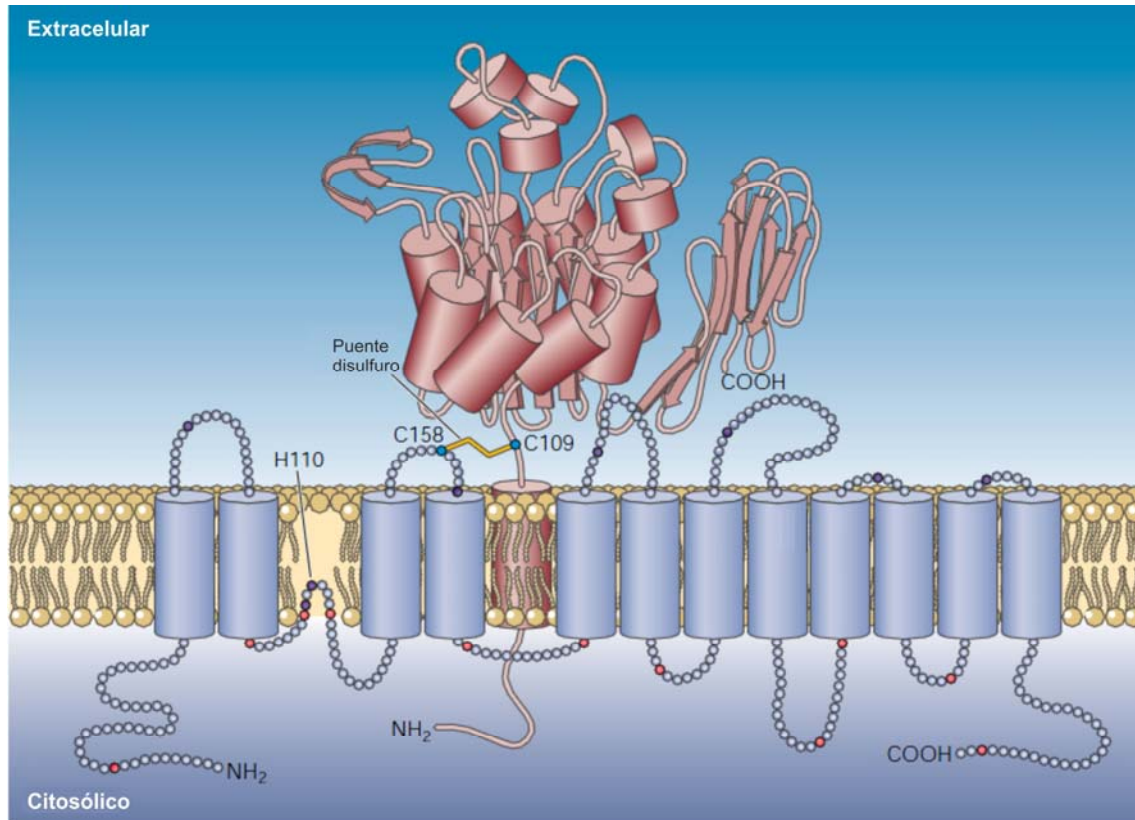
4F2hc (*heavy chain*), también conocido como CD98hc (nombre otorgado a su homólogo murino), pertenece a un grupo de unas 200 proteínas de la superficie de leucocitos implicadas en la respuesta inmune. Desde su descubrimiento en 1981 como parte del antígeno de superficie 4F2 que conduce a la activación de linfocitos T (Haynes y col., 1981), se han desvelado diferentes aspectos estructurales de la proteína así como su implicación en distintos procesos celulares.

### 1.1.1. Estructura de la proteína 4F2hc

Estudios bioquímicos dieron a conocer que el antígeno de superficie 4F2 es un heterodímero de aproximadamente 120 kDa, en el que ambas subunidades se encuentran unidas por un puente disulfuro: una cadena pesada glicosilada de 85 kDa (4F2hc) y una cadena ligera de aproximadamente 40 kDa (4F2 *light chain*) (Haynes y col., 1981).

El cDNA de 4F2hc humano se clonó en 1987 (Lumadue y col., 1987; Quackenbush y col., 1987; Teixeira y col., 1987). La secuencia codifica una proteína de 529 aminoácidos; 4 asparaginas localizadas en el dominio C-terminal que podrían potencialmente sufrir glicosilación (Deves y Boyd, 2000). Asimismo, esta región contiene varias serinas (Ser<sup>305/307/309/426/430</sup>) susceptibles de fosforilarse por ectoquinasas como la ecto-caseína quinasa 2 (CK2, *Casein Kinase 2*) (Nguyen y col., 2008). También se ha descrito en esta región C-terminal un dominio PDZ de clase II (aminoácidos 520-259) que permite la interacción de 4F2hc con proteínas extracelulares que contengan ese dominio, como es el caso de la hCASK (*human CALcium/calmodulin-dependent Serine Kinase*). En la secuencia del dominio PDZ se encuentra una tirosina potencialmente fosforilable, que podría regular interacciones proteicas de 4F2hc en el espacio extracelular (Yan y col., 2007). Hay que destacar la presencia de dos cisteínas (Cys<sup>109</sup> y Cys<sup>330</sup>), estando la primera de ellas implicada en la formación del puente disulfuro con la cadena ligera (Pfeiffer y col., 1998; Torrents y col., 1998).

4F2hc se clasificó empleando algoritmos de topología de membrana y perfiles de hidrofobicidad como una glicoproteína de membrana de tipo II, por el C-terminal extracelular, un único segmento transmembrana (aminoácidos 83-106) y el N-terminal intracelular (Palacín y col., 1998). Esta predicción, fue demostrada experimentalmente por Fenczik y colaboradores (Fenczik y col., 2001) (Figura 1).



**Figura 1. Disposición del transportador heteromérico de aminoácidos en la membrana.** La cadena pesada del transportador (4F2hc, marrón) y una cadena ligera (en este caso xCT, azul) están unidas covalentemente por un puente disulfuro (amarillo). 4F2hc es una glicoproteína de membrana de tipo II con un gran dominio C-terminal y un pequeño segmento citosólico. La topología de la subunidad ligera xCT, como modelo de las otras cadenas ligeras, muestra 12 segmentos transmembrana, con el N- y C-terminal localizados intracelularmente y con una estructura tipo bucle reentrante entre los bucles intracelulares IL2-3. (Palacín y col., 2005).

En la búsqueda de posibles transportadores de aminoácidos mediante experimentos de expresión/clonación en *Xenopus laevis*, se identificó un homólogo de 4F2hc denominado rBAT; ambas pertenecen a la familia génica *SLC3* (*Solute Carrier 3*) (Bertran y col., 1992; Wells y Hediger, 1992). Esta glicoproteína tiene 150 residuos más que 4F2hc y, al igual que su homólogo, carece de péptido señal que la dirija hacia la membrana, presenta un perfil de hidrofobicidad casi idéntico y comparte un 28% de identidad de secuencia con 4F2hc. Además, existen 4 motivos estructurales de 10-18 aminoácidos altamente conservados (67-80% de homología) en el dominio extracelular (Palacín, 1994). Al igual que rBAT, 4F2hc es capaz de inducir transporte de



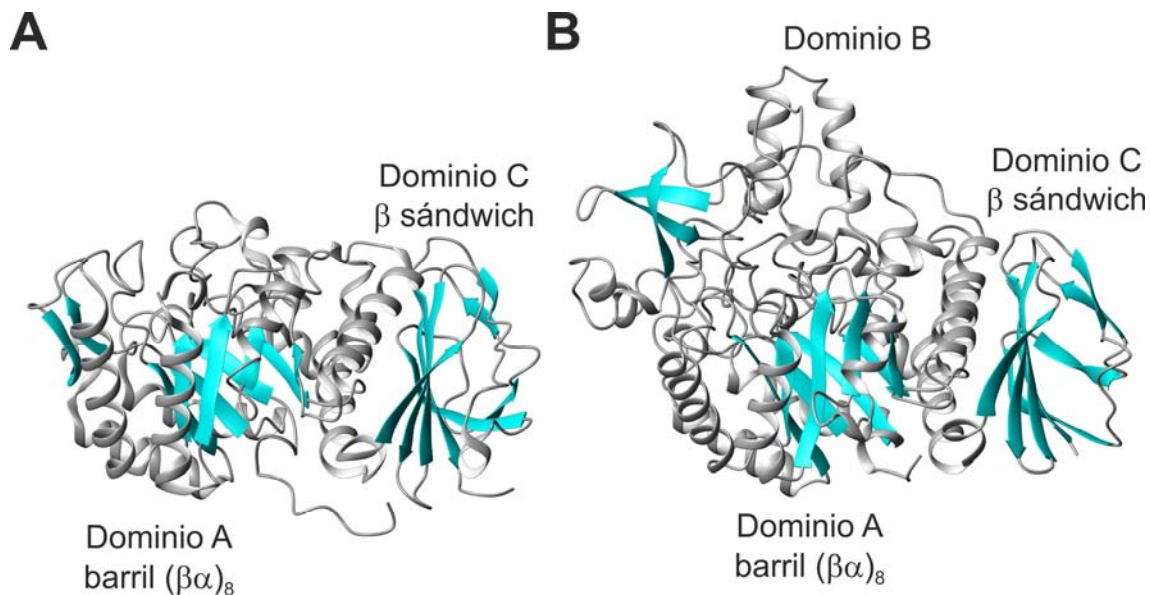
aminoácidos en oocitos de *Xenopus* (Bertran y col., 1992). Esta capacidad de transporte es debida a su asociación con una de las cadenas ligeras descritas.

La estructura del dominio C-terminal de 4F2hc y rBAT presenta homología con la maltasa de insectos y con las  $\alpha$ -glucosidasas bacterianas (alrededor de un 30% de identidad de secuencia) (Wells y Hediger, 1992). Estas enzimas pertenecen a la familia 13 de las glicosil hidrolasas, la cual junto a las familias 70 y 77 se conocen frecuentemente como  $\alpha$ -amilasas (Gabrisko y Janecek, 2009).

Las  $\alpha$ -amilasas tienen una estructura similar con varios dominios. Todas presentan un dominio catalítico, que consiste en un barril de 8 láminas  $\beta$  paralelas rodeado por 8 hélices  $\alpha$  ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> o barril TIM, denominado dominio A. La maquinaria catalítica reside en 3 residuos: un aspártico localizado en la lámina A $\beta$ 4 actuando como nucleófilo, un glutámico en la A $\beta$ 5 como donador de protones y otro aspártico en la A $\beta$ 7 estabilizando el estado de transición (Gabrisko y Janecek, 2009). Mediante cristalografía se observó la existencia de un bucle que interrumpe el dominio A entre la tercera lámina  $\beta$  (A $\beta$ 3) y la tercera hélice  $\alpha$  (A $\alpha$ 3) y que es considerado como el dominio B. Este dominio contiene un sitio de unión a calcio que está muy conservado en la familia. No obstante, las mayores diferencias en secuencia se encuentran en esta región donde podrían residir las distintas especificidades enzimáticas (Janecek y col., 1997). Hacia el C-terminal se encuentra el dominio C, que muestra una estructura de barril  $\beta$  de 8 láminas  $\beta$  antiparalelas. Se cree que esta región está implicada en la estabilización del dominio catalítico protegiendo los residuos hidrofóbicos del dominio A del disolvente e incluso que podría ayudar en la unión del sustrato (Watanabe y col., 1997; Dauter y col., 1999). En algunas enzimas de la familia existe además una región que precede al dominio catalítico conocida como dominio N, del que aún se desconoce su función (MacGregor y col., 2001).

Aunque se intentaron realizar predicciones de estructura secundaria del ectodominio de 4F2hc y del de rBAT basándose en la estructura tridimensional de la oligo-1,6-glucosidasa de *Bacillus cereus* (Watanabe y col., 1997), no ha sido hasta 2007 cuando se resolvió la estructura tridimensional del ectodominio de 4F2hc (4F2hc-ED) mediante difracción de rayos X (Fort y col., 2007). Tanto el cristal ortorrómbico como el monoclinico (resueltos a una resolución de 2,8 y 2,1 Å, respectivamente) indican que 4F2hc-ED está compuesto por un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> y un sándwich de 8 láminas  $\beta$  antiparalelas, lo que se correspondería con el dominio A y C de las  $\alpha$ -amilasas, respectivamente (Figura 2). Sin embargo, carece de la tríada catalítica y sólo se

conserva el residuo que actúa como nucleófilo, pero en una posición diferente; en ese lugar queda una hendidura amplia y profunda con distinta forma a la encontrada en las  $\alpha$ -amilasas. Por lo tanto, la estructura indica que, a pesar de su similitud con estas enzimas, 4F2hc-ED no tiene actividad glicosidasa. De hecho, no se ha detectado esta actividad enzimática empleando una variedad de sustratos (D-glucosa, D-galactosa, derivados de D-manosa) (Fort y col., 2007).



**Figura 2. Homología de la estructura del ectodominio de 4F2hc con las  $\alpha$ -amilasas.** Se representa la estructura tridimensional (A) del ectodominio de 4F2hc (PDB ID: 2DH2) y (B) de la oligo-1,6-glucosidasa de *Bacillus cereus* (PDB ID: 1UOK). 4F2hc-ED está compuesto por un barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, y sándwich de 8 láminas  $\beta$  antiparalelas, lo que se correspondería con el dominio A y C de la glucosidasa. Además, la amilasa contiene el dominio B (situado entre los anteriores), el cual parece estar implicado en la especificidad de la actividad enzimática. El ectodominio carece de dominio B; en su lugar queda una hendidura que podría servir como sitio de unión para otras proteínas.

A pesar de que 4F2hc-ED no posee actividad enzimática, podría mantener las propiedades de unión de las glicosidasas de forma similar a otras proteínas derivadas de las glicosidasas, como las citoquinas Ym1/2, que muestran actividad lectina (Chang y col., 2001; Tsai y col., 2004). Desafortunadamente no se ha encontrado ningún hidrato de carbono capaz de interactuar con el ectodominio tras emplear un *chip* con más de 260 hidratos de carbono (Fort y col., 2007). Otra posibilidad es que la hendidura sirva de sitio de unión para otras proteínas, o glicoproteínas, ya que se ha observado que algunos inhibidores de las glicosidasas con estructura tipo inmunoglobulina, como el tendamistat, se unen al sitio catalítico (Wiegand y col., 1995). Por ello se ha propuesto

que ciertas proteínas, como la galectina-3, la ICAM-1 o el CD147, podrían interactuar con 4F2hc-ED. De hecho, 4F2hc es uno de los receptores mayoritarios para la galectina-3 en células Jurkat y macrófagos murinos (Dong y Hughes, 1997). La galectina-3 pertenece a una familia de proteínas que se unen a glicoconjugados que contienen galactosa mediante un dominio de unión a hidratos de carbono (CRD, *Carbohydrate Recognition Domain*) presente en la región C-terminal (Hughes, 1994). Sin embargo, en este caso la interacción de la galectina-3 con 4F2hc posiblemente sea debida a la capacidad que tiene la primera de oligomerizar y entrecruzar los glicanos presentes en proteínas de la superficie celular (Yang y col., 2008) y es capaz de promover la dimerización de 4F2hc (Hughes, 2001).

A partir de la identificación de un ortólogo funcional de 4F2hc en *Drosophila* denominado CG2791, se han comparado secuencias de la proteína entre vertebrados e invertebrados. Además de los residuos implicados en la dimerización de 4F2hc, se ha identificado una segunda pequeña superficie hidrofóbica conservada en el dominio C-terminal ubicada sobre la membrana plasmática. Se ha propuesto que esta región conservada podría representar una región de interacción proteína-proteína, y que no estaría presente en las  $\alpha$ -amilasas (Reynolds y col., 2009).

En el cristal ortorrómbico empleado para la resolución de la estructura de 4F2hc-ED se observó un homodímero coordinado con un átomo de  $Zn^{2+}$  en la interfaz entre ambas subunidades. Además, en las células HeLa la sobreexpresión de las dos versiones marcadas de 4F2hc (con un *tag* de HA en el C-terminal o bien con un tag de 6 histidinas en el N-terminal) puso de manifiesto en la presencia de monómeros y homodímeros en la superficie celular. La interacción entre monómeros se forma por un puente disulfuro entre los residuos de Cys<sup>109</sup>. En este sentido, la mutación Cys<sup>109</sup>Ser conduce a defectos en la N-glicosilación, por lo que se sugiere que la homodimerización ayuda a la maduración y al tráfico de 4F2hc (Fort y col., 2007).

La resolución de la estructura de 4F2hc-ED sugiere que la localización del N-terminal del ectodominio, que incluye a la Cys<sup>109</sup>, impone fuertes restricciones estructurales con respecto a la disposición de 4F2hc en la membrana y a las interacciones con la cadena ligera en el heterodímero. Esto es debido a que tanto el monómero como el homodímero muestran una distribución de carga polarizada, con una superficie positiva en el N-terminal hacia ese residuo de Cys y el dominio transmembrana. Por lo tanto, parece existir una interacción electrostática entre 4F2hc-

ED y las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana plasmática (Fort y col., 2007).

### 1.1.2. Regulación de la expresión génica

El gen *SLC3A2* localizado en el cromosoma 11q13 codifica la proteína 4F2hc humana y parece estar regulado por distintos mecanismos moleculares que tienen lugar por la activación de distintas vías de señalización. El cDNA deriva de una única copia génica altamente conservada durante la evolución de mamíferos (Quackenbush y col., 1987). El gen abarca 8 kb y está compuesto por 9 exones. La región 5' *upstream* del gen muestra son características de genes que se expresan de forma constitutiva en todos los tejidos (genes domésticos). Carece de caja TATA y secuencias CCAAT, pero es rico en secuencias GC, y se han identificado cuatro sitios de unión del factor de transcripción Sp1 (Gottesdiener y col., 1988). La secuenciación del promotor indica que el mayor sitio de iniciación de la transcripción se encuentra 129 bp por delante del primer ATG, lo que concuerda con lo identificado en otros genes con promotores sin caja TATA (Yan y col., 2007). Además, análisis estructurales de la cromatina indican que *SLC3A2* presenta de forma estable sitios hipersensibles a DNasa I tanto en el flanco 5' como en regiones del intrón 1, lo que se asocia con genes transcripcionalmente activos. Dentro de un fragmento de 255 bp del gen de 4F2hc que contiene 154 bp de la región flaqueante 5' podría existir un intensificador (*enhancer*), ya que ese fragmento es capaz de promover la expresión de un gen reportero tras su transfección en células Jurkat (Gottesdiener y col., 1988; Deves y Boyd, 2000).

Aunque el gen de 4F2hc se expresa constitutivamente, se ha comprobado que existe un gran incremento transcripcional de 4F2hc cuando se induce la activación de linfocitos T de sangre periférica por fitohematoglutina (Gottesdiener y col., 1988). Esta lectina es capaz de promover la activación de distintas vías de señalización, como translocación y activación de PKC (*Protein Kinase C*) o un incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. Además, la región 5' del gen de 4F2hc tiene homología con otros genes inducibles en células T, como el gen de la interleuquina-2, la dihidrofolato reductasa, el receptor de transferrina o la timidina quinasa, entre otros. La coestimulación con ésteres de forbol (activadores de PKC) e ionóforos induce la expresión de 4F2hc en linfocitos, mientras que la presencia de EGTA en el cultivo bloquea este efecto estimulatorio (Lindsten y col., 1988; Tanaka y col., 1988).

El primer intrón del gen *SLC3A2* contiene un intensificador de unos 187 bp que es activo en una amplia variedad de células (Leiden y col., 1989). En este intensificador se han encontrado los sitios de unión de dos proteínas nucleares (NF-4FA y NF-4FB) que flanquean una secuencia consenso de unión del factor de transcripción inducible AP-1. Deleciones de estas secuencias muestran que todas son necesarias para lograr una actividad completa del intensificador (Karpinski y col., 1989).

Durante el proceso inflamatorio intestinal, se ha observado una sobreexpresión transcripcional de 4F2hc en el epitelio colónico mediada por la citoquina proinflamatoria interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) (Kucharzik y col., 2005). A partir de estos indicios, se ha caracterizado la región promotora de 4F2hc investigando el mecanismo de activación transcripcional inducido por IFN- $\gamma$  (Yan y col., 2007). Tras la clonación del promotor humano (-1030 hasta +4 bp) en de las células Caco BBE, se han encontrado los 4 posibles sitios de unión para Sp1 descritos anteriormente, además de otro sitio para D1 (regulador del gen de la alcohol deshidrogenasa), un elemento de respuesta a estrés, un sitio de unión para Nkx-2 y para NF $\kappa$ B así como para factores de transcripción de choque térmico. Se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, que Sp1 y NF $\kappa$ B interaccionan con el promotor de 4F2hc tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ .

Recientemente se ha demostrado que la expresión de 4F2hc está regulada transcripcionalmente por diversos miRNA en células epiteliales intestinales durante los procesos de diferenciación e inflamación intestinal (Nguyen y col., 2010). Por medio de una base de datos de los miRNA que revisa la región 3'UTR (Untranslated Region) del gen objeto de estudio, se obtuvo el posible miRNA que complementa la secuencia del gen. El miR-7 es capaz de inhibir la expresión de 4F2hc humano (miR-706 para su homólogo murino) por unión directa a la región 3' UTR del gen. Se ha propuesto una relación inversa entre la expresión de 4F2hc y la diferenciación celular, ya que las células diferenciadas tienen menores niveles de la proteína, hecho correlacionado con mayores niveles de miR-7. Además la expresión del miR-7, mediante la represión de 4F2hc, inhibe la activación de integrina- $\beta$ 1 lo que afecta a procesos como la adhesión celular. Asimismo, durante el proceso de inflamación intestinal, la producción de una citoquina proinflamatoria como la interleuquina 1- $\beta$  promueve la expresión de 4F2hc y reprime los niveles de miR-7. Así, la represión del miR-7 parece ser uno de los mecanismos que subyacen a la sobreexpresión de 4F2hc humano durante los desórdenes inflamatorios que ocurren en el intestino.

### 1.1.3. Funciones de 4F2hc

Se ha descrito la participación de 4F2hc en múltiples y variadas funciones celulares, a continuación se recogen algunas de las mejor estudiadas.

#### *Transportador de aminoácidos, poliaminas y hormonas tiroideas*

La expresión de 4F2hc, así como la de su homólogo rBAT induce el transporte de aminoácidos en oocitos de *Xenopus laevis* (Bertran y col., 1992; Bertran y col., 1992; Wells y Hediger, 1992). A pesar de ser los responsables de ese transporte funcional, la topología de estas proteínas con un único segmento transmembrana, no era la típicamente esperada para un transportador de aminoácidos. Su estructura contrastaba con la de otros transportadores de aminoácidos y transportadores, tanto de aminoácidos como de otras moléculas, los cuales contienen de 10 a 14 segmentos transmembrana (Estévez y col., 1998; Deves y Boyd, 2000). Esto fomentó la hipótesis de que rBAT y 4F2hc podrían actuar como moduladores o subunidades reguladoras de los transportadores formando parte de un heterodímero. Estudios de transporte de aminoácidos en oocitos mostraron que la actividad transportadora inducida por 4F2hc estaba limitada por su asociación con una proteína endógena del oocito, ya que la saturación del transporte ocurría a una baja expresión de 4F2hc y aunque se incrementara su expresión no se obtenía más transporte. Además, esta asociación implicaba la formación de un puente disulfuro mediante la Cys<sup>109</sup>, ya que el transporte de aminoácidos se afectaba tanto por la modificación covalente de residuos de cisteína en condiciones reductoras como por la generación del mutante C<sup>109</sup>S de 4F2hc. Todas estas evidencias permitieron confirmar que la unidad mínima para que tenga lugar el transporte de aminoácidos es el heterodímero (Estévez y col., 1998).

Se han identificado 9 cadenas ligeras, todas pertenecientes a la familia génica *SLC7* (*Solute Carrier 7*); seis de ellas se asocian con 4F2hc, mientras que sólo una forma heterodímero con rBAT (b<sup>0,+</sup>AT) (Verrey y col., 2004). La composición y características de los transportadores heterodiméricos de aminoácidos se recogen en la Tabla I. Las cadenas ligeras son proteínas de unos 502-535 aminoácidos, no glicosiladas y muy hidrofóbicas, lo que se manifiesta en una mayor movilidad electroforética (~40 kDa). Presentan 12 dominios transmembrana, con el N- y el C-terminal localizados intracelularmente, encontrándose en el caso de la subunidad xCT una estructura tipo bucle rentrante entre los lazos intracelulares 2 y 3 (Nakamura y col., 1999; Gasol y col., 2004). Además, la cadena ligera se une a la cadena pesada mediante la formación de

Tabla I. Transportadores heterodiméricos de aminoácidos.

Cadena pesada	Cadena ligera	Nomenclatura HUGO	Localización cromosómica	Tipo de transporte	Características del transporte	Localización tisular y celular	Identificación Ref.
4F2hc		SLC3A2	11q3			Ubicua, en células epiteliales, membrana basolateral	
	LAT1	SLC7A5	16q24.3	Sistema L	aa voluminosos y aromáticos	Altos niveles en cerebro, placenta y músculo	(Kanai y col., 1998; Mastroberardino y col., 1998)
	LAT2	SLC7A8	14q11.2		independiente de Na <sup>+</sup>	esquelético	(Rossier y col., 1999)
	y+LAT1	SLC7A7	14q11.2	Sistema y+L	aa catiónicos	Túbulos proximales del riñón, intestino delgado, ovario, placenta y cerebro	(Torrents y col., 1998) (*)
	y+LAT2	SLC7A6	16q22.1		aa neutros largos dependiente de Na <sup>+</sup>	Células epiteliales riñón, pulmón e intestino delgado	(Pfeiffer y col., 1998)
	Asc-1	SLC7A10	19q12-13	asc	aa pequeños y neutros, independiente de Na <sup>+</sup>	Ubicua, Cerebro, corazón, testículos, riñón, intestino delgado y glándula parótida	(Fukasawa y col., 2000)
rBAT	xCT	SLC7A11	4q28-q32	x <sup>c</sup> -	Antiporte L-Glu/cistina, independiente de sodio	Cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, placenta y músculo esquelético	(Sato y col., 1999)
		SLC3A1	2p16.3-21			Macrófagos activados, células en cultivo, cerebro	(**)
	b <sup>0</sup> +AT	SLC7A9	19q12-13	b <sup>0</sup> +	aa dibásicos y neutros, independiente de Na <sup>+</sup>	Células epiteliales en riñón, intestino delgado, hígado, páncreas, membrana apical	(***) (Rajan y col., 1999)
?	AGT1	SLC7A13	8q21.3	-	transportador de Asp <sup>-</sup> y Glu <sup>-</sup> , independiente de Na <sup>+</sup>	Riñón, intestino delgado, membranas en borde cepillo	(Matsuo y col., 2002)
	Asc-2	SLC7		asc	aa pequeños y neutros, independiente de Na <sup>+</sup>	Riñón, placenta, bazo, pulmón y músculo esquelético, membrana basolateral	(Chairoungdua y col., 2001)

HUGO: *Human Genome Organisation*; aa: aminoácidos; implicado en la LPI (\*) o en la cistinuria de tipo I (\*\*) o no tipo I (\*\*\*); Las citas bibliográficas referentes a las cadenas pesadas se recogen en el texto.

un puente disulfuro a través de una cisteína localizada en el bucle extracelular entre los dominios transmembrana 3 y 4 (Pfeiffer y col., 1998). Su topología de membrana las relaciona filogenéticamente con la familia de transportadores LAT (*L-type Amino acid Transporters*) que transportan aminoácidos neutros (ramificados y aromáticos), catiónicos o aniónicos (Verrey y col., 1999). Todas las cadenas ligeras identificadas son transportadores de aminoácidos cuando se asocian con la correspondiente cadena pesada (4F2hc o rBAT), por lo que se les conoce como transportadores heteroméricos de aminoácidos (HAT, *Heteromeric Amino acid Transporters*) o transportadores de aminoácidos asociados a glicoproteínas (gpaAT, *glycoprotein-associated Amino acid Transporters*) (Deves y Boyd, 2000; Verrey y col., 2000; Chillarón y col., 2001). La estructura de dichos transportadores se muestra en la Figura 1.

Aunque se ha descrito la expresión monomérica de 4F2hc en la superficie celular, esta cadena pesada tiene un papel crítico en el control del tráfico intracelular así como en la topología de membrana del heterodímero 4F2. La cadena ligera por sí sola casi no se expresa en la superficie celular, permaneciendo retenida en el aparato de Golgi, mientras que en presencia de la cadena pesada alcanza la superficie celular. Por lo tanto, 4F2hc actúa como molécula guía permitiendo que la cadena ligera alcance la membrana plasmática. Este efecto de orientación ocurre independientemente de la formación del puente disulfuro, probablemente debido a interacciones estéricas no covalentes (Nakamura y col., 1999). Un mecanismo similar de interacción ocurre en las ATPasas tipo P, como la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Esta bomba de intercambio iónico está compuesta por una subunidad catalítica con varios dominios transmembrana (subunidad  $\alpha$ ) y una glicoproteína de tipo II (subunidad  $\beta$ ), donde ésta última se requiere para la estabilización, maduración funcional y como guía de la subunidad  $\alpha$  desde el retículo endoplasmático hasta la membrana celular (Geering, 1991).

El dominio extracelular de 4F2hc es indispensable para que se produzca el transporte de aminoácidos; ya que si éste se reemplaza por el perteneciente a CD69, la proteína quimérica es incapaz de estimular el transporte de isoleucina. Sin embargo, el intercambio del dominio citoplasmático o del transmembrana no afecta a la función transportadora de aminoácidos (Fenczik y col., 2001).

Asimismo, cabe destacar que se ha descrito un transporte bidireccional de aminoácidos mediado por 4F2hc/LAT1 que regula la activación de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) vía eflujo de L-Gln y captura de L-Leu y otros aminoácidos



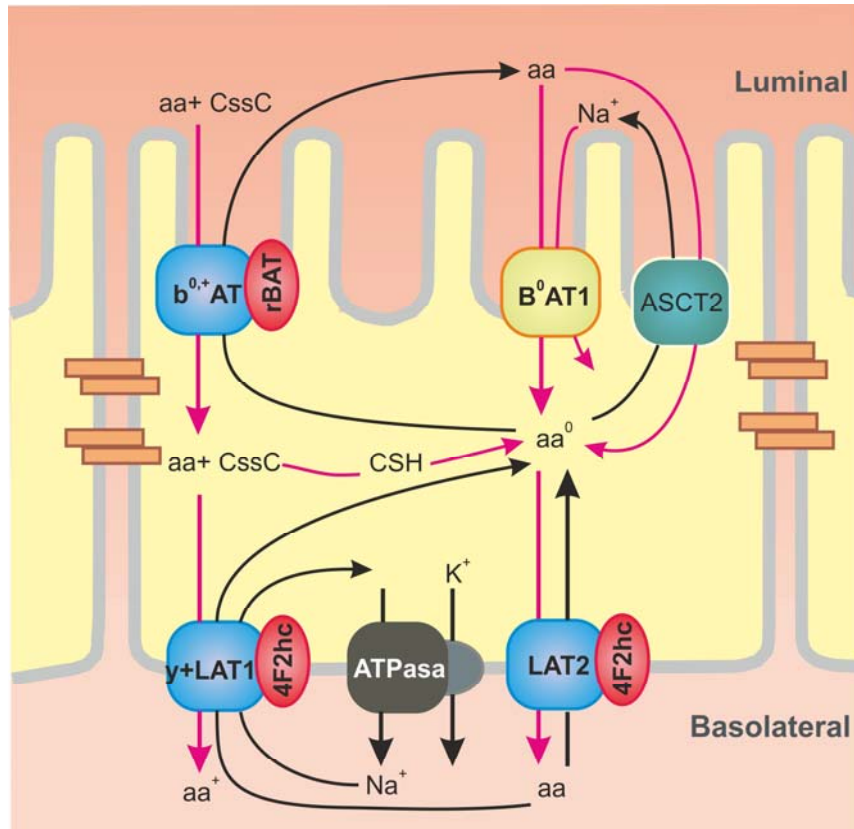
esenciales. Este transporte provoca una activación de mTOR que se traduce en una inhibición de la autofagia y un incremento de la síntesis proteica, promoviendo el crecimiento y la proliferación celular. Este hallazgo puede contribuir a explicar la implicación de 4F2hc en tumorigénesis (Nicklin y col., 2009).

La especificidad del sustrato transportado por el heterodímero depende exclusivamente de la naturaleza de la cadena ligera (Deves y Boyd, 2000). En la Tabla I se recogen las cadenas ligeras descritas, la correspondiente cadena pesada con la que se asocia así como el tipo de transporte que realizan.

Otro aspecto a tener en cuenta en el transporte heteromérico de aminoácidos es que existe una expresión celular diferencial entre 4F2hc y rBAT. Mientras que rBAT se expresa principalmente en la membrana plasmática apical de células epiteliales del túbulo proximal de riñón y de la mucosa intestinal, 4F2hc se encuentra restringido a una localización más basolateral (Palacín y col., 1998). Por lo que distintos transportadores están implicados en la reabsorción renal o absorción intestinal de aminoácidos. En la Figura 3 se muestra la disposición de dichos transportadores de aminoácidos.

Deficiencias en el transporte de aminoácidos causadas por defectos genéticos dan lugar a las denominadas aminoacidurias primarias heredadas (PIA, *Primary Inherited Aminoacidurias*), alterándose la reabsorción renal de aminoácidos y posiblemente a la absorción intestinal y al transporte de aminoácidos en otros órganos (Palacín y col., 2005). Mutaciones en rBAT y en la cadena ligera b<sup>0,+</sup>AT provocan un defecto en la reabsorción de cistina y aminoácidos dibásicos conocido como cistinuria tipo I (Calonge y col., 1994), mientras que las encontradas en la cadena ligera y<sup>+</sup>LAT1 (Torrents y col., 1999) causan intolerancia proteica lisinurica (LPI, *Lysinuric Protein Intolerance*) que cursa con una masiva excreción de aminoácidos dibásicos, especialmente lisina, y una reducida absorción intestinal. No se han encontrado mutaciones asociadas al gen *SLC3A2* de 4F2hc (Palacín y col., 2005); mutaciones en esta cadena no son viables, ya que la eliminación del gen en ratones provoca la muerte durante la vida embrionaria (Tsumura y col., 2003).

Aunque la función principal del heterodímero es el transporte de aminoácidos, se ha descrito que estos transportadores asociados a glicoproteínas son capaces de transportar sustratos adicionales como poliaminas y hormonas tiroideas.



**Figura 3. Transportadores implicados en la reabsorción renal e intestinal de aminoácidos.** Distribución de los transportadores heteroméricos en la membrana apical o basolateral de células epiteliales de los túbulos proximales del riñón o del intestino delgado. El flujo de reabsorción de aminoácidos se muestra en rosa. La alta concentración de aminoácidos neutros ( $aa^0$ ) debido al transporte apical ( $B^0AT1$ ) y basolateral ( $y+LAT1$ -4F2hc), promueve la reabsorción activa de aminoácidos dibásicos ( $aa^+$ ) y cistina (CysC), junto con el potencial de membrana y la reducción de CysC a cisteína (CSH). Además en este transporte de aminoácidos parece estar implicado el transportador ASCT2. (Palacín y col., 2005).

### Modulación de integrinas

Las células secretan, ensamblan y remodelan las proteínas de la matriz extracelular (ECM, *ExtraCellular Matrix*), entre las que se encuentran por ejemplo la fibronectina, los colágenos, las lamininas y los proteoglicanos. Además, otras moléculas como factores de crecimiento, citoquinas y hormonas se localizan en la ECM. A parte de actuar como un andamio para las células, la ECM es capaz de controlar el comportamiento celular estableciendo interacciones con las células (Guo y Giancotti, 2004; Berrier y Yamada, 2007). Las adhesiones célula-matriz son esenciales para la migración celular, la organización de tejidos, la diferenciación y el desarrollo embrionario. Estas señales de adhesión cooperan con otras vías de señalización para

regular la supervivencia celular, la proliferación, la cicatrización de heridas y la tumorigénesis (Berrier y Yamada, 2007).

Las integrinas son una superfamilia de receptores de adhesión celular que se unen a ligandos de la ECM, de la superficie celular o bien a ligandos solubles (Hynes, 2002). Cada integrina es un heterodímero, estabilizado por uniones no covalentes, que se compone de dos subunidades transmembrana de tipo I denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . En mamíferos se han descrito 18 subunidades  $\alpha$  y 8  $\beta$ , que se asocian dando lugar a 24 receptores diferentes capaces de unir varios ligandos de la ECM con distinta afinidad (Humphries y col., 2006). Además de unirse a ligandos de la ECM y a cationes divalentes mediante los dominios extracelulares, las integrinas también pueden asociarse lateralmente con otras proteínas de la superficie celular como las tetraspaninas, los receptores de factores de crecimiento o las proteasas de matriz (Miranti y Brugge, 2002).

Las integrinas transmiten información mecanoquímica de forma bidireccional a través de la membrana plasmática proporcionando un mecanismo de conexión entre el exterior y el interior celular. La adhesión celular a la ECM transmite información por medio de las integrinas regulando la señalización intracelular, es lo que se conoce como señalización *outside-in*, que es importante en extensión y migración celular. Por el contrario, señales intracelulares pueden inducir cambios en la conformación y activación de las integrinas que alteren su actividad de unión a los ligandos, en un proceso denominado señalización *inside-out* (Ginsberg y col., 2005; Luo y col., 2007).

Las integrinas no sólo influyen en el comportamiento celular proporcionando un punto de anclaje célula-ECM, sino que también lo hacen por acción de sus dominios intracelulares. Estos dominios (de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud) forman complejos multimoleculares con proteínas implicadas en señalización y proteínas adaptadoras que conectan con el citoesqueleto (Hynes, 2002).

La señalización intracelular de las integrinas implica el reclutamiento de proteína quinasas no receptoras como FAK (*Focal Adhesion Kinase*) o quinasas pertenecientes a la familia Src. La autofosforilación de FAK desencadena el acoplamiento de adaptadores moleculares como Grb2 activando Ras y, por tanto, la vía de señalización ERK/MAPK. Además FAK está implicada en la activación de PI3K/Akt, PKC y en la regulación de la familia de Rho GTPasas. Scr podría bien ser reclutada por FAK, o bien unirse directamente al dominio citoplasmático de la integrina  $\beta 1$ , causando la fosforilación de proteínas adaptadoras como p130Cas y

paxilina, y la activación de Rac conduciendo a la activación de PAK (*p21-Activated Kinase*), JNK (*Jun N-terminal Kinase*) y NFκB (*Nuclear Factor κB*) (Guo y Giancotti, 2004; Mitra y col., 2005; Berrier y Yamada, 2007).

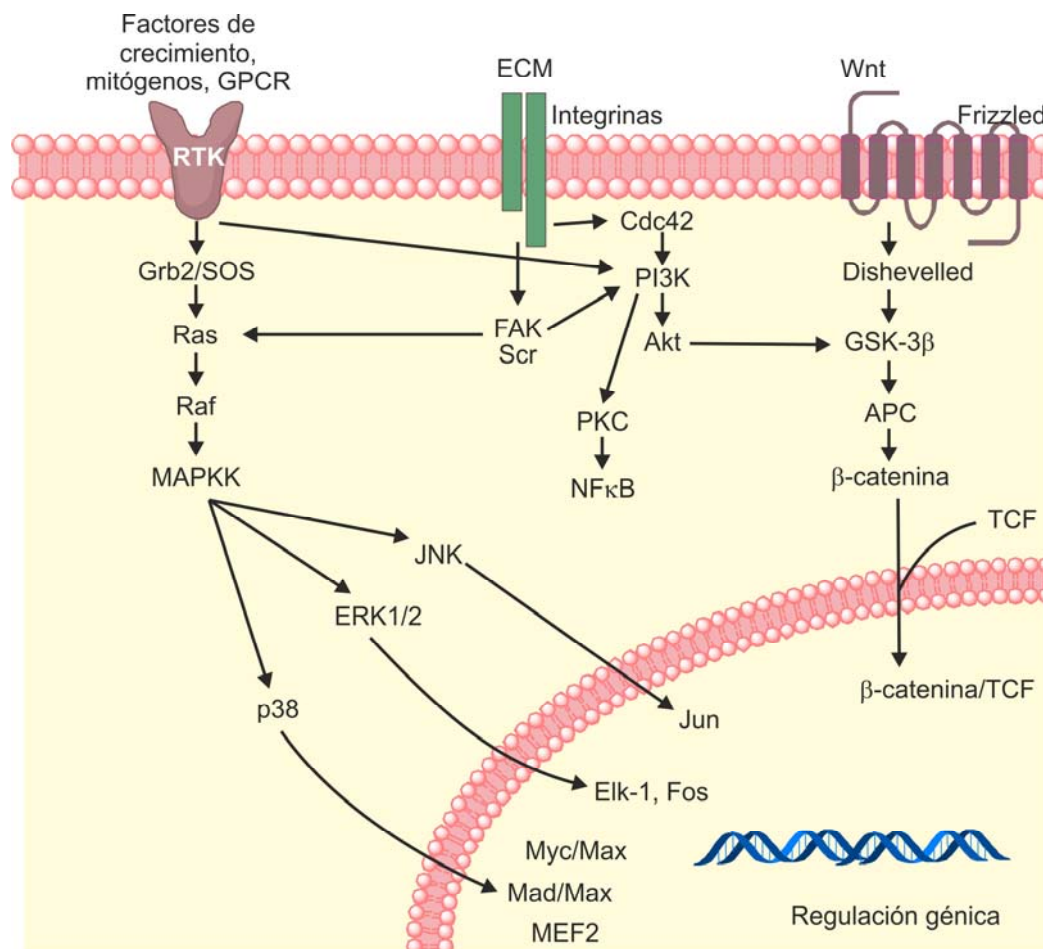
### **4F2hc en la señalización integrina**

La conexión entre 4F2hc e integrinas surge de una estrategia de complementación genética en la que se identificó 4F2hc como un posible modulador de la activación de integrinas (Fenczik y col., 1997).

Estudios *in vitro* demuestran que 4F2hc se une específicamente a las integrinas β1A y β3, pero no con la variante específica de músculo β1D o la de leucocitos β7 (Zent y col., 2000). La interacción específica entre 4F2hc y la integrina β1 se observó mediante coinmunoprecipitación utilizando distintas líneas celulares (Kolesnikova y col., 2001; Merlin y col., 2001; Rintoul y col., 2002). La asociación de 4F2hc con la cadena ligera no se requiere para dicha interacción. Utilizando quimeras con 4F2hc y la CD69, se determinó que tanto el dominio transmembrana como el citoplasmático de 4F2hc son necesarios para unirse a la integrina β1A. El transporte de aminoácidos y las interacciones con integrinas son dos actividades independientes mediadas por distintos dominios de 4F2hc (Fenczik y col., 2001).

El entrecruzamiento de 4F2hc con anticuerpos es capaz de estimular la adhesión dependiente de integrinas β1 en células pequeñas de cáncer de pulmón y en células de cáncer de mama (Fenczik y col., 1997; Chandrasekaran y col., 1999). Sin embargo, ese incremento en adhesión no se observa en presencia de los fragmentos Fab monovalentes del anticuerpo anti-4F2 C-13, indicando que se requiere el agrupamiento de 4F2hc para estimular la función integrina (Fenczik y col., 1997). De hecho la activación de 4F2hc mediada por anticuerpo conduce a un incremento de la expresión y el agrupamiento de las integrinas β1 en la superficie celular, requiriéndose FAK, Scr y un citoesqueleto funcional de actina para inducir la adhesión (Kim y Hahn, 2008). Las vías de señalización relacionadas con integrinas y otras respuestas celulares se resumen en la Figura 4.

En la transducción de la señal por integrinas, el entrecruzamiento de 4F2hc con anticuerpos promueve la proliferación y la activación de PI3K (*Phosphoinositol-3OH Kinase*), así como de su producto PIP<sub>3</sub> y su efector *downstream* Akt/PKB, de una manera dependiente de integrina β1 y FAK (Rintoul y col., 2002). Asimismo 4F2hc promueve la activación de FAK, paxilina y Akt así como la formación de fibras de estrés mediante



**Figura 4. Rutas de señalización.**

activación de RhoA en trofoblastos, siendo esta última quinasa junto a PI3K esenciales para la estimulación de la fosforilación de FAK dependiente de integrina  $\alpha v \beta 3$  (Kabir-Salmani y col., 2008). Además el entrecruzamiento de 4F2hc induce agregación celular mediante la translocación a la membrana de PKC $\delta$ , pero no de otras isoformas de PKC, y la fosforilación de ERK1/2 (Cho y col., 2003); confirmándose que la activación de ERK1/2 es un evento de señalización tardío dependiente de la participación de PI3K y posterior activación de PKC $\delta$  (Melchior y col., 2008).

La delección de 4F2hc en células madre embrionarias permitió esclarecer su papel en la señalización integrina. Estas células carentes de 4F2hc expresan niveles normales de integrina  $\beta 1$  manteniéndose la capacidad de unión a sus ligandos solubles, lo que indica que 4F2hc no regula la afinidad de las integrinas (Feral y col., 2005). Por el contrario, se afectan otros procesos celulares dependientes de integrina, como migración, extensión y resistencia de las células a la muerte celular inducida por

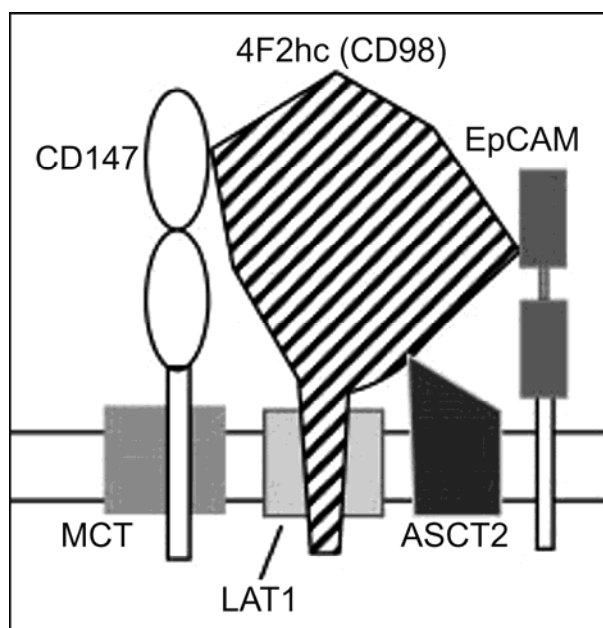
ausencia de anclaje (*anoikis*). Estos defectos se asocian con una pérdida de la señalización dependiente de integrinas, como la activación de FAK, Akt, p130CAS/Rac y RhoA (Feral y col., 2005; Feral y col., 2007). Esta deficiencia se restaura al introducir en las células una proteína quimérica que tiene la capacidad de unirse a integrinas, pero no a transportadores de aminoácidos (Feral y col., 2005).

### *Metabolismo energético*

La regulación de los niveles energéticos celulares es un proceso fundamental para la vida de un organismo. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein Kinase*) se ha descrito como un indicador del balance energético celular. Una vez activada, cuando disminuye el contenido en ATP, se promueve la expresión y/o actividad de proteínas implicadas en el catabolismo y se reducen las actividades de biosíntesis. Este sensor refleja el estatus energético celular en respuesta a variaciones nutricionales ambientales (Carling, 2005; Hardie y col., 2012).

Además de interaccionar en la membrana con las cadenas ligeras y con integrinas, 4F2hc también se asocia con CD147 para formar el eje de un complejo multiproteico que desempeña un papel crítico en el metabolismo energético (Xu y Hemler, 2005). CD147, también conocido como EMMPRIN (*Extracellular Matrix MetalloProteinase Inducer*), es una proteína de la superficie celular que induce la producción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y ácido hialurónico, se asocia con transportadores de monocarboxilatos e integrinas y está implicada en el proceso reproductivo, neural, inflamatorio y tumoral (Toole, 2003; Marieb y col., 2004). Al igual que 4F2hc, CD147 es una glicoproteína de membrana que actúa como chaperona para los transportadores de monocarboxilatos (MCT1 y MCT4), posibilitando su inserción en las membranas y, en último término, facilitando el transporte de lactato y piruvato (Kirk y col., 2000).

El complejo multiproteico formado por 4F2hc y CD147 junto a sus correspondientes transportadores (LAT1 y MCT) también incluye a otro transportador de aminoácidos (ASCT2) así como a una proteína implicada en proliferación de células epiteliales (EpCAM) (Figura 5). Se ha descrito que el silenciamiento de 4F2hc conduce a la represión de la expresión de CD147 y viceversa, imposibilitando que los transportadores lleguen a la membrana; además, se observa un descenso de la proliferación celular así como una activación de la AMPK. Por lo tanto, el complejo



**Figura 5. Complejo multiproteico formado por 4F2hc-CD147 en la membrana plasmática.** 4F2hc y CD147 se asocian directamente en la membrana. A su vez, 4F2hc interacciona con una de las cadenas ligeras (LAT1 en el esquema), mientras que CD147 hace lo propio con los transportadores de monocarboxilatos (MCT1 y MCT4). Además, formando parte de este complejo, se encuentran otro transportador de aminoácidos (ASCT2) y una proteína implicada en la proliferación (EpCAM). (Xu y Hemler, 2005).

4F2hc-CD147 tiene un papel crítico en el metabolismo energético probablemente debido a la coordinación del transporte de aminoácidos y lactato (Xu y Hemler, 2005).

#### *Implicación en la respuesta inmune*

Se ha descrito que 4F2hc forma parte de un complejo macromolecular de señalización en el que se encuentra la integrina  $\beta 1$  y el receptor de células T (TCR, *T-Cell Receptor*) mostrándose una asociación específica entre 4F2hc y la integrina  $\alpha 4\beta 1$  en células T humanas (Miyamoto y col., 2003).

La delección de 4F2hc conduce a un fallo en la expansión clonal de las células B y de la diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpo. Sin embargo, la expresión de una forma mutante de 4F2hc, que media la señalización integrina pero no el transporte de aminoácidos, mantiene la proliferación de células B deficientes en la cadena pesada no mutada (Cantor y col., 2009).

Asimismo, la pérdida de 4F2hc en células T suprime específicamente su proliferación inducida por antígeno a la vez que previene la autoinmunidad (Cantor y

col., 2011; Lian y col., 2012). La interacción entre células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> dirigidas contra autoantígenos es la responsable de la progresión de un buen número de enfermedades autoinmunes, incluyendo la diabetes mellitus tipo 1. En el caso de la diabetes autoinmune experimental, aunque las células T deficientes en 4F2hc permanecen en los islotes pancreáticos, su defecto en la expansión clonal provoca la protección frente a la enfermedad (Cantor y col., 2011). Además, se ha propuesto la aplicación clínica de estrategias dirigidas contra 4F2hc como posibles tratamientos frente a la diabetes tipo 1 así como a otras enfermedades autoinmunes mediadas por células T (Lian y col., 2012).

### *Desarrollo embrionario*

El intento de generar ratones *knockout* para 4F2hc a través de la interrupción del gen mediante recombinación homóloga resultó en la obtención de ratones heterocigotos fértiles con apariencia normal, pero ningún ratón homocigoto, lo que sugiere que la interrupción del gen de 4F2hc causa letalidad embrionaria. El análisis de los contenidos del útero indicó que el punto de letalidad de los embriones homocigóticos tenía lugar rápidamente tras la implantación (E3,5) (Tsumura y col., 2003). Esta letalidad temprana en las células madre embrionarias que carecen de 4F2hc muestran una actividad proliferativa debilitada que podría deberse al defecto en la señalización integrina (Feral y col., 2005). De forma similar, los embriones que no expresan integrina  $\beta 1$ , mueren rápidamente tras la implantación (Fassler y Meyer, 1995). Por otro lado, la delección de 102 aminoácidos del dominio extracelular de 4F2hc, región indispensable para que ocurra el transporte de aminoácidos, también conduce a un fenotipo embrionario letal pero los embriones sobreviven hasta el día E7,5 (Fenczik y col., 2001; Sato y col., 2011).

### *Fusión celular*

La fusión celular, que conduce a la formación de células multinucleadas, es un rasgo característico de los organismos multicelulares. Este proceso biológico es importante en el desarrollo, observándose durante la fusión de gametos en la fertilización y en la morfogénesis de la placenta, así como en el desarrollo del músculo esquelético (fibra muscular estriada) y en la osteoclastogénesis. Además, existen células gigantes multinucleadas (MGC, *Multinucleated Giant Cells*) que se originan a partir de la fusión de monocitos/macrófagos como consecuencia de la aparición de lesiones granulomatosas en respuesta a cuerpos extraños (implantes), virus y bacterias



(tuberculosis). Asimismo algunos virus requieren el mecanismo de fusión para entrar en el hospedador (Mori y col., 2004; Dalton y col., 2007; Helming y Gordon, 2007).

La proteína 4F2hc es idéntica a la proteína FRP-1 (*Fusion Regulatory Protein 1*) (Ohgimoto y col., 1995), cuya expresión es necesaria para que ocurra la fusión celular (Ito y col., 1992). Se requiere la proteína intacta para esta función, como se ha confirmado empleando una proteína quimérica con otro dominio intracelular (Okamoto y col., 1997). El uso de anticuerpos anti-4F2hc induce la agregación celular homotípica y la formación de las MGC a partir de monocitos en ausencia de agentes fusogénicos (Tsurudome y Ito, 2000).

La interacción de 4F2hc con otras moléculas de adhesión de la superficie celular también tiene su repercusión durante la fusión. Se ha observado que la fusión mediada por 4F2hc en células transfectadas con gp160 del HIV es dependiente de integrinas, lo que se ha confirmado empleando anticuerpos anti-integrinas  $\beta 1$  o  $\beta 2$  (Ohta y col., 1994; Cho y col., 2001). Además de regular el metabolismo energético junto a 4F2hc, CD147 parece estar implicado también en la fusión celular. Algunos anticuerpos anti-CD147 son capaces de suprimir o estimular la agregación celular y la fusión celular mediada por 4F2hc inducida por anti-4F2hc o HIV, respectivamente (Cho y col., 2001; Mori y col., 2004).

### *Proliferación y transformación maligna*

4F2hc se expresa en todos los tipos celulares con excepción de las plaquetas, y su nivel de expresión es aún mayor en tejidos muy proliferativos como el tracto gastrointestinal y los túbulos proximales del riñón (Rossier y col., 1999; Dave y col., 2004). También se describió que 4F2hc se expresa mucho en tejido tumoral humano así como en líneas celulares tumorales establecidas, independientemente del tejido de origen (Bellone y col., 1989; Dixon y col., 1990). Una expresión incrementada de 4F2hc se correlaciona con el desarrollo, la progresión y el potencial metastásico de las células tumorales. Además de considerarse un posible oncogén, 4F2hc se ha identificado como un indicador de mal pronóstico tras el análisis de su expresión en muestras de pacientes con cáncer de laringe, mama, pulmón o riñón (Esteban y col., 1990; Essegir y col., 2006; Kaira y col., 2009; Prager y col., 2009; Kaira y col., 2011; Furuya y col., 2012). Además, 4F2hc se ha relacionado con la adquisición del fenotipo resistente a drogas (MDR, *MultiDrug Resistance*) así como con metástasis, causando fallo del tratamiento y mortalidad de los pacientes. El silenciamiento de uno de los

componentes del complejo 4F2hc/CD147 incrementa la sensibilidad de las células a cisplatino a la vez que disminuye el eflujo de la droga mediante la reducción de la expresión de la glicoproteína-P (Yang y col., 2007).

4F2hc está implicado en los procesos de proliferación y supervivencia celular, considerándose el aumento de su expresión como marcador de activación de la proliferación (Diaz y col., 1997; Fogelstrand y col., 2009). Así, los niveles de expresión de 4F2hc son menores en células quiescentes, incrementándose significativamente al entrar en el ciclo celular. El uso de anticuerpos anti-4F2hc, o la delección del gen, han revelado la implicación de 4F2hc en la proliferación de distintos sistemas celulares como los linfocitos T y B, las células musculares lisas de la vasculatura, los queratinocitos de la capa basal de la piel y las células madre embrionarias (Feral y col., 2005; Lemaitre y col., 2005; Cantor y col., 2009; Fogelstrand y col., 2009; Cantor y col., 2011). Asimismo empleando proteínas quiméricas, se ha comprobado que la región de 4F2hc que interacciona con la integrina  $\beta 1$  es suficiente para promover la supervivencia y proliferación celular (Cantor y col., 2009; Fogelstrand y col., 2009), mediante la modulación de los eventos de señalización dependientes de integrina, como la activación de FAK y PI3K/Akt (Feral y col., 2005). Además, se ha sugerido que el elemento intensificador transcripcional que se encuentra en el primer intrón del gen de 4F2hc podría estar implicado en el incremento de la expresión de 4F2hc que tiene lugar tras la activación celular (Karpinski y col., 1989).

Los elevados niveles de expresión de 4F2hc en la superficie de células tumorales están relacionados con la adquisición y progresión del fenotipo maligno. La sobreexpresión exógena de 4F2hc conduce a la transformación maligna de células NIH3T3, confiriéndoles la capacidad de desarrollar tumores *in vivo* (Hara y col., 1999). Además el entrecruzamiento de 4F2hc promueve el crecimiento tanto independiente de anclaje como de suero a través de integrinas (Hara y col., 1999; Rintoul y col., 2002; Henderson y col., 2004), siendo ambos característicos de un fenotipo transformado. La delección de 4F2hc interfiere significativamente en la habilidad de células madre embrionarias para formar teratocarcinomas en ratones; no obstante, estas células recuperan la capacidad tumorigénica cuando se reexpresa 4F2hc o la proteína quimérica que contiene exclusivamente el dominio que interacciona con las integrinas (Feral y col., 2005). Por lo tanto, 4F2hc se considera un potencial oncogén, en el que la región transmembrana (aminoácidos 82-87) parece ser crítica a la hora de proporcionar

un nuevo mecanismo de tumorigénesis mediado por integrinas (Rintoul y col., 2002; Henderson y col., 2004).

La transformación oncogénica de una célula epitelial hacia un tumor maligno implica eventos genéticos, entre los que se incluyen la activación de genes que promueven la proliferación (oncogenes) y la inactivación de genes supresores de tumores (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011). En muchos tipos de cáncer se han observado anormalidades de la función integrina como resultado de la transformación por oncogenes (Zou y col., 2002) y, lo que es aún más importante, el crecimiento tumoral depende de la función de las integrinas  $\beta 1$  (Weaver y col., 1997). Se ha descrito que las actividades de las PI3K y Akt desempeñan un papel central regulando supervivencia celular, transformación y promoviendo el crecimiento celular independiente de anclaje (Khwaja y col., 1997). Se ha observado que la transformación celular causada por la sobreexpresión de 4F2hc depende de la activación de PI3K mediada por FAK, donde la activación de PI3K depende de la interacción de las integrinas  $\beta 1$  con 4F2hc y, además, se asocia con la redistribución de integrinas (Henderson y col., 2004; Feral y col., 2005). Aunque no se han descrito mutaciones puntuales en 4F2hc asociadas a tumorigénesis, las mutaciones que promueven su interacción con integrinas podrían estar implicadas en el desarrollo de la tumorigénesis (Henderson y col., 2004).

La mutación puntual del residuo de Cys<sup>109</sup> de 4F2hc elimina su actividad transformadora en células BALB3T3 y reduce el transporte de aminoácidos. En este sentido, la formación del heterodímero es esencial para lograr la transformación maligna así como para que la cadena ligera alcance la membrana (Shishido y col., 2000). Este hecho permitiría que las células transformadas incrementen los transportadores de aminoácidos con el fin de mantener unos altos niveles de síntesis proteica necesarios para el crecimiento y la proliferación (Christensen, 1990); de hecho, la sobreexpresión de algunas de las cadenas ligeras, como LAT1, se han correlacionado con el fenotipo maligno, llegando incluso a proponerse como una potencial diana terapéutica (Kaira y col., 2008; Kaji y col., 2010).

### 1.2. METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Las metaloproteinasas de matriz (MMP, *Matrix MetalloProteinases*) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc responsables de la degradación de los componentes de la ECM y de la activación de factores de crecimiento, receptores de la superficie celular y moléculas de adhesión que se encuentran en un estado latente (Chakraborti y col., 2003). Las MMP están implicadas en algunos procesos fisiológicos relacionados con la degradación de la ECM, como la cicatrización, la remodelación de tejidos, la angiogénesis y el desarrollo embrionario (Sternlicht y Werb, 2001). Por el contrario, un exceso de actividad de estas endopeptidasas es importante en el desarrollo de varias enfermedades, entre las que se incluyen la artritis reumatoide, la osteoartritis, enfermedades autoinmunes de la piel, la invasión tumoral y la metástasis (Yan y Boyd, 2007).

En condiciones fisiológicas, las actividades de las MMP son reguladas a través de varios mecanismos: a nivel transcripcional, por activación del zimógeno precursor (pro-MMP) y por inhibición de su actividad mediante inhibidores endógenos conocidos como TIMP (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*) (Libra y col., 2009). La familia génica de las MMP está actualmente formada por 24 miembros, que en función de su estructura y su especificidad de sustrato se clasifican en subgrupos. En esta familia se encuentran proteínas secretadas al espacio pericelular y proteínas unidas a membrana (Overall y Lopez-Otin, 2002). La mayoría de las MMPs secretadas se sintetizan como zimógeno, donde el ion zinc del sitio catalítico interacciona con un residuo de cisteína perteneciente al prodominio. Sólo tras la escisión proteolítica del prodominio (llevada a cabo intracelularmente por convertasas como furina o extracelularmente por otras MMP o por serínproteasas, como plasmina), la enzima es proteolíticamente activa (Sternlicht y Werb, 2001).

#### *CD147/EMMPRIN, las MMP y cáncer*

La migración y la invasión celular son procesos críticos en la diseminación metastásica de las células tumorales y en la formación de metástasis. Las etapas iniciales de la invasión tumoral dependen de la actividad de las células tumorales para invadir el tejido circundante a través de la modulación de la adhesión célula-célula y célula-matriz y de la degradación de la ECM (Ludwig, 2005). Un aumento en la expresión de enzimas remodeladoras de la ECM como las MMP, posibilita a las células tumorales adquirir motilidad y capacidad invasiva como parte de la transición epitelio-

mesénquima (EMT, *Epithelial-Mesenchymal Transition*) que, en último término determina el desarrollo de metástasis (Radisky y Radisky, 2010).

En la mayoría de los tumores malignos los fibroblastos del estroma son la fuente primaria de las MMP, aunque también éstas son producidas por las propias células malignas. Además las células inflamatorias infiltradas en el área del tumor producen estas enzimas en el ambiente peritumoral, a la vez que secretan citoquinas que incrementan la expresión de las MMP por células tumorales y estromales. Por otro lado, las propias células tumorales producen factores que aumentan la producción de las MMP por fibroblastos (Biswas y col., 1995). La expresión de las MMP es inducida además de por citoquinas, por factores de crecimiento, por promotores de tumores, por estrés físico, por transformación oncogénica y por interacciones célula-célula y célula-matriz (Westermarck y Kahari, 1999).

La búsqueda de factores capaces de inducir a las MMP en células tumorales condujo a la identificación de la proteína CD147/EMMPRIN como una molécula capaz de estimular la producción de varias MMP y factores angiogénicos (como VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) en los fibroblastos del estroma y en las células tumorales (Toole, 2003; Tang y col., 2005). CD147/EMMPRIN es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y está compuesta por dos dominios inmunoglobulina (Ig) extracelulares, un dominio transmembrana y una pequeña región citoplasmática de 39 aminoácidos (Muramatsu y Miyauchi, 2003; Gabison y col., 2005). El primer dominio Ig se requiere para la autoasociación y para que se estimule la producción de las MMP mientras que el segundo es necesario para su interacción con caveolina-1 (Sun y Hemler, 2001). Además, el grado de glicosilación de la proteína es funcionalmente relevante con respecto a la inducción de las MMPs. La forma altamente glicosilada de la proteína es la que induce la producción de las MMP, mientras que la forma menos glicosilada es secuestrada en la membrana por caveolina-1 impidiendo la autoasociación de CD147/EMMPRIN y por tanto la inducción de las MMP (Tang y col., 2004).

CD147/EMMPRIN es una proteína multifuncional que también interacciona con transportadores de los monocarboxilatos (MCT1 y MCT4) facilitando su expresión en la membrana plasmática, regula la entrada de calcio, actúa como receptor de ciclofilinas y es clave en el metabolismo energético junto a 4F2hc. Se ha correlacionado su expresión elevada en distintos tipos de cáncer con invasión y metástasis (estimulando la producción de las MMP, del VEGF y del ácido hialurónico) así como

con adquisición del fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*) mediante la expresión de la glicoproteína-P (Sun y Hemler, 2001; Muramatsu y Miyauchi, 2003; Toole, 2003; Yang y col., 2003; Xu y Hemler, 2005; Li y col., 2007; Pan y col., 2012).

Tanto el tratamiento exógeno de fibroblastos con CD147/EMMPRIN recombinante como la transducción adenoviral de fibroblastos con la proteína en células no tumorales provocan un aumento de la expresión de las MMP (Li y col., 2001). CD147/EMMPRIN es capaz de inducir la expresión de varias MMP como MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 y MMP-11 (Guo y col., 1997; Sun y Hemler, 2001; Gou y col., 2010; Piao y col., 2012). Además CD147/EMMPRIN induce la expresión de las MMP por medio de la vía de señalización de las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), mientras que estimula la angiogénesis tumoral mediante activación de la ruta PI3K/Akt (Tang y col., 2006; Li y col., 2007).

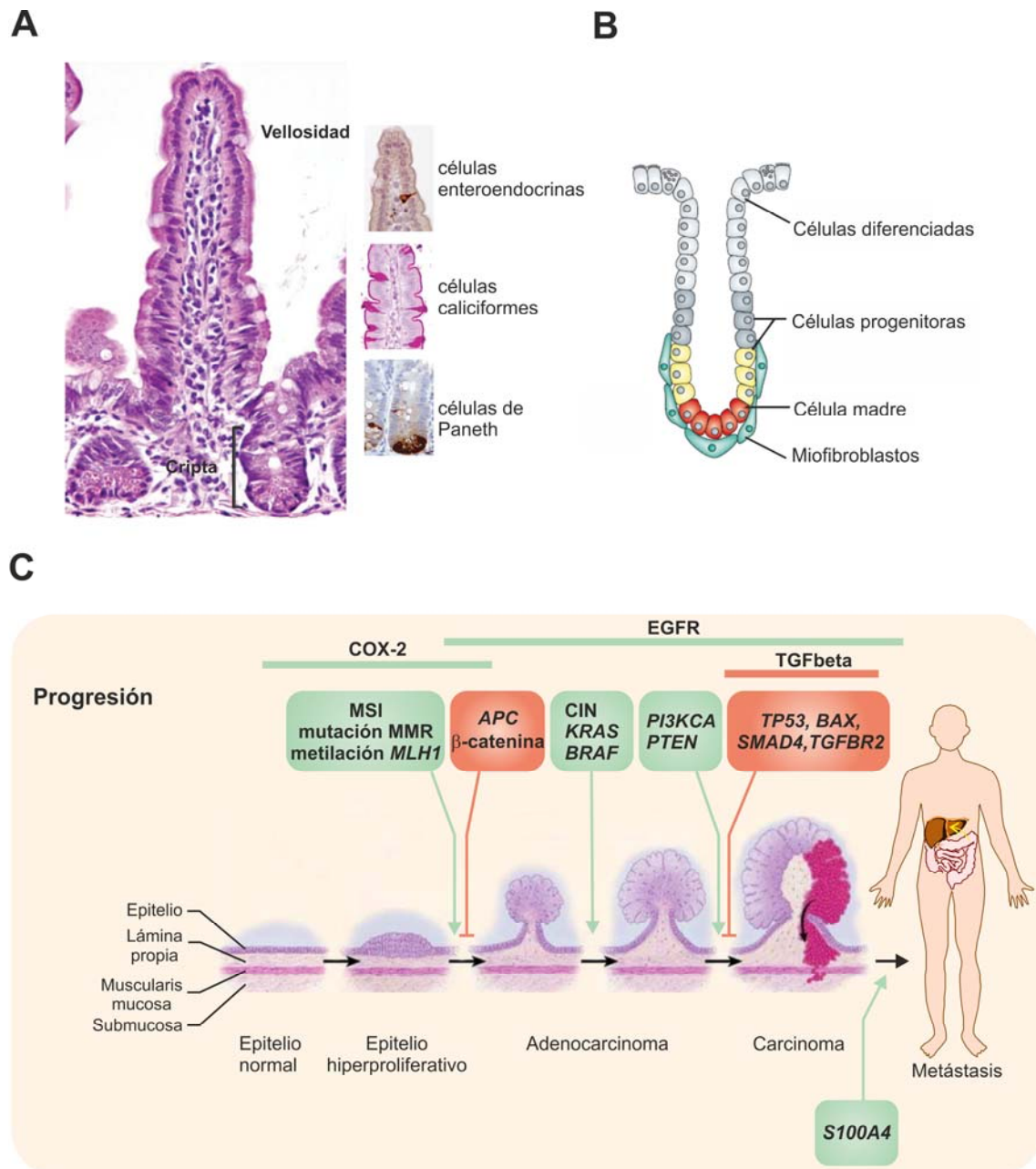
La actividad de MMP-2 y MMP-9 se han correlacionado con el proceso de invasión tumoral y metástasis (Fernandes y col., 2008). Ambas MMP (conocidas como gelatinasas) pueden degradar el colágeno de tipo IV, que es un componente de la lámina basal, la primera barrera para la invasión tumoral (Vihinen y Kahari, 2002). La expresión de la MMP-2 y la MMP-9 es elevada en carcinomas y se asocia con un menor grado de diferenciación de los tumores y acelerada progresión tumoral (Kodate y col., 1997; Ikebe y col., 1999; Maeta y col., 2001; Schmalfeldt y col., 2001; Gou y col., 2010). A partir de estas evidencias y de estudios de correlación entre la expresión de las MMP y el grado o agresividad del tumor, o bien entre la expresión/actividad de la MMP y el riesgo de metástasis o la recurrencia de enfermedad, se ha considerado el uso de las MMP como marcadores para predecir la recurrencia del tumor en distintos tipos de cáncer (Vihinen y Kahari, 2002; Piao y col., 2012). De hecho, una expresión alta de estas gelatinasas respecto a la expresión de cadherina-E sirve para predecir la recurrencia y muerte en cáncer pancreático (Kuniyasu y col., 1999).

La inhibición de la actividad de las MMP en el espacio extracelular se ha estudiado como estrategia para inhibir el crecimiento e invasión de las células neoplásicas. Sin embargo, aunque desde 1980 se han desarrollado distintos inhibidores, lamentablemente, ninguno de ellos ha proporcionado un resultado positivo (Fingleton, 2008).

### **1.3. EPITELIO COLÓNICO**

La función del tracto intestinal es la digestión y la absorción de nutrientes. El lumen intestinal está recubierto por un epitelio especializado simple, que realiza las funciones primarias de digestión y absorción de agua y nutrientes, y además es una barrera para los patógenos luminales. El intestino está anatómicamente dividido en intestino delgado y grueso. El epitelio intestinal es el epitelio que más enérgicamente se renueva en mamíferos (Heath, 1996). Está compuesto por las propias células epiteliales absorptivas, o enterocitos (denominadas colonocitos en la región colónica), células enteroendocrinas (células de los gránulos basales), células caliciformes (secretoras de mucina) y las células de Paneth (claves en la inmunidad innata en la defensa contra patógenos) (Figura 6A). Este epitelio se caracteriza por formar unas invaginaciones en la capa de tejido conectivo subyacente para formar las unidades básicas del intestino, las criptas. La organización modular del epitelio del intestino delgado y del colon en criptas es globalmente comparable, con dos diferencias importantes histológicamente: la superficie del epitelio colónico es plana, no tiene microvellosidades, y, además, carece de células de Paneth (van der Flier y Clevers, 2009). En el colon hay aproximadamente  $10^7$  millones de criptas que se caracterizan por albergar en su región basal una pequeña población de células madre (entre 1-10 células madre por cripta) (Figura 6B). Éstas proliferan rápidamente dando lugar a células progenitoras que se dividen unas 4-5 veces y se van comprometiendo con un linaje celular intestinal específico a la vez que migran hacia la parte superior de la cripta. Allí se diferencian terminalmente en una célula intestinal especializada y tres días después alcanzan la parte superior de la vellosidad donde sufren apoptosis espontánea y se liberan al lumen intestinal (Humphries y Wright, 2008; van der Flier y Clevers, 2009; Degirolamo y col., 2011).

La homeostasis del epitelio intestinal se fundamenta en un delicado balance entre autorenovación y diferenciación, que debe mantenerse durante la vida. El epitelio intestinal tiene una alta tasa de renovación y, por lo tanto, procesos como proliferación, migración y muerte celular deben estar rigurosamente regulados para asegurar la homeostasis. A pesar de la diversidad de respuestas celulares, estos procesos están controlados por un número relativamente pequeño de vías de señalización entre las que se incluyen Wnt, Notch, TGF- $\beta$ /BMP y Hedgehog (Sancho y col., 2004; Radtke y col., 2006).



**Figura 5. Epitelio intestinal y carcinogénesis colorrectal.** (A) El intestino se caracteriza por presentar un epitelio simple, organizado en invaginaciones de la mucosa denominadas criptas y en protrusiones denominadas vellosidades. Entre las células que forman este epitelio, o enterocitos, se encuentran células caliciformes, enteroendocrinas y células de Paneth. (B) Representación esquemática de una cripta colónica. Las células madre se localizan en la base de la cripta, donde se comunican con las células del nicho como los miofibroblastos. Además, dan lugar a progenitores que transitoriamente proliferan a la vez que van migrando hacia la parte superior de la cripta y comprometiéndose con un linaje intestinal específico. (C) Durante la progresión de la carcinogénesis colorrectal ocurren alteraciones genéticas y epigenéticas en oncogenes (verde) y genes supresores de tumores (rojo). En la figura se recogen algunos de los genes que están implicados.



La proliferación de las células madre de las criptas está determinada por la vía de señalización Wnt. De hecho, esta vía de transducción es activa en un gradiente, encontrándose la actividad más alta en la base de la cripta. Además, estudios funcionales han demostrado que la señalización Wnt constituye el principal interruptor entre la proliferación y la diferenciación de las células epiteliales, siendo su activación esencial para mantener a los progenitores en la cripta intestinal (van der Flier y Clevers, 2009). Asimismo se considera que la señalización Wnt actúa de forma sinérgica junto a Notch, manteniendo las células de la cripta en un estado indiferenciado, actuando como guardianes de la autorenovación en el epitelio intestinal, aunque Notch parece tener funciones adicionales en la especificación del linaje de los enterocitos (Radtke y col., 2006; van der Flier y Clevers, 2009).

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más común diagnosticado en hombres tras el cáncer de pulmón y de próstata, y el segundo en mujeres después del cáncer de mama (Jemal y col., 2011). Casi el 60% de los casos ocurren en regiones desarrolladas. Los índices de incidencia en ambos sexos varían un orden de magnitud en todo el mundo: los índices más altos corresponden a Australia, Nueva Zelanda y Europa occidental, mientras que los más bajos a África (con la excepción de Sudáfrica) y a Asia central y meridional. La incidencia de este tipo de cáncer es mayor en hombres que en mujeres (Ferlay y col., 2010; Jemal y col., 2011).

Los análisis histológicos han demostrado que el desarrollo de un tumor es un proceso multiseccional, que abarca desde un adenoma muy pequeño hasta los carcinomas metastásicos. Este proceso engloba múltiples eventos genéticos que resultan en la activación de oncogenes y en la inactivación de genes supresores de tumores (Fearon y Vogelstein, 1990; Vogelstein y Kinzler, 2004). La naturaleza de estos eventos incluye mutación, pérdida de heterocigosidad, silenciamiento epigenético de la transcripción génica modificando el patrón de metilación y acetilación, amplificación génica y translocaciones que generan proteínas con actividad oncogénica (Fearhead y col., 2002).

Desde hace años se viene empleando la carcinogénesis colorrectal como modelo para entender las modificaciones genéticas y epigenéticas que tienen lugar durante la tumorigénesis epitelial, ya que este tipo de cáncer presenta un amplio rango de lesiones accesibles (desde un foco aberrante en la cripta hasta llegar a un carcinoma) (Fearon y Vogelstein, 1990; Wong y col., 2007). Asimismo, debe tenerse en cuenta que estas alteraciones genéticas no son exclusivamente hereditarias, sino que pueden

desencadenarse mediante la exposición a distintos factores ambientales, como la dieta, y a procesos inflamatorios crónicos, como las enfermedades inflamatorias intestinales (Terzic y col., 2010). Al modelo inicial propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990, que aún continúa vigente, se le han incluido eventos epigenéticos que también regulan esta neoplasia (Wong y col., 2007). Las claves que permiten comprender esta oncogénesis multiseuencial derivan de los conocimientos derivados del cáncer colorrectal hereditario; lo que ha permitido profundizar en las causas del cáncer esporádico.

Los factores ambientales juegan un papel dominante en la etiología de la mayoría de los cánceres colorrectales. Sin embargo, los factores hereditarios son significativos solamente en el 10-15% de los casos. Aproximadamente en el 5% de todos los casos, el cáncer se asocia con un síndrome hereditario dominante altamente penetrante. La forma heredada más común de éstos se conoce como cáncer colorrectal no polipósico (HNPCC, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) o síndrome de Lynch, que es responsable del 2-4 % de los casos. Se caracterizan por mutaciones en alguno de los genes de la maquinaria de reparación del DNA (MMR, *MisMatch Repair*), lo que provoca la acumulación de errores en las secuencias repetitivas de DNA conocidas como microsatélites, resultando en la inestabilidad de microsatélites (MIN, *Microsatellite INstability*). Además, este síndrome se manifiesta a una edad joven y está asociado con la aparición de otros adenocarcinomas en ovario, endometrio, estómago o tracto urinario. Se han identificado 5 genes implicados: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2*. Aunque la mayoría de las secuencias del DNA microsatélite se encuentra en intrones, ciertos genes los llevan en sus regiones codificantes. De hecho, en tumores de cáncer colorrectal no polipósico se han identificado defectos del sistema de reparación en el gen de  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), en el receptor del factor de crecimiento transformante (*TGFB2*) y en el gen de la proteína proapoptótica Bax (Radtke y col., 2006).

Además existe otro síndrome hereditario que es responsable de menos del 1% de todos los casos, la poliposis adenomatosa familiar (FAP, *Familial Adenomatous Polyposis*). Los pacientes se reconocen con facilidad, ya que presentan de cientos a miles de pólipos adenomatosos en el colon. Aunque los adenomas son generalmente considerados como benignos, el gran número de pólipos hacen que sean más propensos a adquirir mutaciones adicionales que puedan provocar el desarrollo de cáncer colorrectal a la edad de 40 años. Este síndrome se caracteriza por presentar mutaciones en el gen supresor de tumores *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) o en el gen

de la MYH hidroxilasa (*MUTYH*, implicada en la reparación de errores en el DNA antes de iniciarse la replicación). APC forma parte del complejo de destrucción que regula la degradación de  $\beta$ -catenina, molécula central de la vía de señalización canónica de Wnt. Mutaciones en *APC* conducen a la estabilización de  $\beta$ -catenina, la cual se transloca al núcleo donde se asocia con factores de transcripción como Tcf/LEF activando la transcripción de genes como *ciclina D1* o *c-myc*, conduciendo a una proliferación incrementada del epitelio intestinal (Radtke y Clevers, 2005). Además, el C-terminal de la proteína APC está implicado en el mantenimiento de la estabilidad cromosomal durante la mitosis, facilitando la unión de los microtúbulos del huso a los cinetocoros (Fodde y col., 2001). Por ello, mutaciones en la proteína conducen a inestabilidad cromosómica (CIN, *Chromosomal INstability*) al fallar la conexión con los cinetocoros, perdiéndose o ganándose cromosomas o partes de ellos durante la división celular (Fodde y col., 2001).

La mutación iniciadora, bien somática o bien heredada, ocurre en la mayoría de los casos en *APC*, aunque también se han propuesto otras vías alternativas en la iniciación de la neoplasia colorrectal (como mutación de los oncogenes *BRAF* o *KRAS*) conduciendo a la formación de adenomas benignos. Asimismo, un paso temprano en el desarrollo de un adenoma es la activación de rutas de señalización dependientes de factores de crecimiento, como el EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) o la respuesta de hiperproliferación dependiente de prostanglandina E2 inducida por inflamación o por estimulación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Posteriormente se van acumulando alteraciones que promueven el avance en la transformación maligna, como mutaciones en *KRAS* o *TP53*, así como deleciones en genes como *DCC* (*Deleted in Colon Cancer*). Durante la transición adenoma-carcinoma ocurre la inactivación de la señalización del TGF $\beta$  mediante la mutación o deleción del gen de su receptor (*TGFBR2*) o del factor de transcripción *SMAD4* o, *SMAD2* y *SMAD3*. En esta misma etapa ocurren mutaciones somáticas en el gen de la subunidad catalítica de PI3K o en la fosfatasa PTEN (Fearon y Vogelstein, 1990; Jass, 2006; Cha y DuBois, 2007; Markowitz y Bertagnolli, 2009).

En la neoplasia colorrectal también se ha descrito la implicación de las modificaciones epigenéticas. Se ha observado una hipometilación global en todo el espectro neoplásico, en las regiones satélites o pericentroméricas de los cromosomas. Esto conduce a inestabilidad genómica o a la activación de oncogenes, como el gen asociado a metástasis *S100A4*. Asimismo, genes supresores de tumores se silencian por medio de la hipermetilación de sus promotores en islas CpG; entre ellos genes

implicados en señalización (*APC*), reparación de DNA (*MLH1*), respuestas mediadas por p53 (*HIC1*), regulación del ciclo celular (*CDKN2A*) e interacciones célula-matriz (*TIMP3*). Además de la metilación, la modificación postraducciona de histonas es otro mecanismo epigenético de la regulación de la expresión génica, aunque no se ha descrito aún ningún gen regulado en la tumorigénesis colorrectal por este mecanismo (Esteller, 2007; Wong y col., 2007). En la Figura 6C se resumen los eventos genéticos y epigenéticos que suelen ocurrir durante la carcinogénesis colorrectal.

### 1.4. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN CARCINOGENESIS

Además de la existencia de defectos genéticos que predisponen al individuo a sufrir cáncer, el riesgo de desarrollar esta enfermedad está también influido por factores ambientales, como lo demuestran los estudios epidemiológicos de migración poblacional. Así, los inmigrantes procedentes de un país con un estilo de vida y unos hábitos alimenticios concretos, y en el que prevalecen unos tipos de cáncer, se ajustan a la incidencia del país hospedador (Oppenheimer, 2001).

Aproximadamente el 5-10% de todos los cánceres son causados por defectos genéticos (mutaciones en la línea germinal), mientras que el 90-95% restante de los casos son originados por factores ambientales y por el estilo de vida (Anand y col., 2008). Entre los factores ambientales que desempeñan un papel clave en la etiología del cáncer se incluyen carcinógenos químicos, la contaminación, los pesticidas o el arsénico presente en agua contaminada. También deben considerarse contaminantes alimenticios, como la micotoxina aflatoxina B1, o sustancias cuya presencia depende cómo se cocinen los alimentos como las aminas heterocíclicas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las N-nitrosaminas, y carcinógenos físicos, como la radiación UV, el amianto y el radón. Además, existen agentes biológicos que también se consideran factores ambientales que promueven la carcinogénesis, como las infecciones causadas por la bacteria *Helicobacter pylori* en cáncer gástrico, el virus del papiloma humano en cáncer uterino y de cuello de útero, o los virus de la hepatitis B y C en el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Minamoto y col., 1999; Boffetta y Nyberg, 2003; Sutandyo, 2010).

La influencia de la dieta y de los componentes del lumen intestinal es especialmente relevante cuando se considera la carcinogénesis colorrectal, ya que en el tracto gastrointestinal se encuentran tanto sustancias mutagénicas como moléculas

procedentes de la comida que disminuyen el riesgo de sufrir cáncer (Goldman y Shields, 2003; Wiseman, 2008).

### 1.4.1. Dieta

La dieta es una de las mayores causas de carcinogénesis en humanos (Anand y col., 2008). El consumo excesivo de calorías, así como de grasas saturadas, la inactividad física, la obesidad y la resistencia a insulina, están asociados con el desarrollo de tumores colorrectales (Birt y col., 1992; Gunter y Leitzmann, 2006; Hursting y col., 2007), mientras que la ingestión de fibra y antioxidantes evita su formación (Minamoto y col., 1999).

Una dieta rica en grasas promueve el cáncer de colon por medio de un incremento en la secreción de ácidos biliares y ácidos grasos en el lumen colónico. La flora microbiana hidroliza los ácidos biliares para formar ácidos biliares secundarios, y éstos, junto a los ácidos grasos libres, pueden dañar las células epiteliales colónicas e inducir una hiperproliferación compensatoria de las células de las criptas (Bernstein y col., 2005).

El descubrimiento de la relación entre la fibra de la dieta y el cáncer se describió alrededor de 1969, a partir de datos epidemiológicos internacionales en las que las dietas ricas en fibra mostraban un papel protector frente al cáncer del intestino grueso (Burkitt, 1969). Se ha encontrado una baja incidencia de cáncer de colon en países africanos y asiáticos, donde se consumen dietas ricas en fibra. Por el contrario la incidencia más alta de este tipo de cáncer se encuentra en las sociedades occidentales, donde los hidratos de carbono refinados reemplazan normalmente a los naturales y, además, la ingesta de fibra disminuye. Por lo tanto, la ingesta de una dieta rica en fibra reduce el riesgo de sufrir cáncer de colon y posiblemente otros cánceres (McIntosh, 1993). La fibra no es el único componente de la dieta que muestra un efecto beneficioso frente a la tumorigénesis colorrectal como la ingesta de folato, calcio, vitamina D y antioxidantes derivados de frutas y verduras frente a la carcinogénesis colorrectal. Además, la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-3 evita la inflamación crónica que incrementa la susceptibilidad de sufrir cáncer (Hall y col., 2007; Johnson y Lund, 2007).

La fibra está compuesta por hidratos de carbono complejos y, atendiendo a sus propiedades físicas, se clasifican en solubles e insolubles. Las primeras, que están presentes en frutas, vegetales y cereales como la avena, son metabolizadas en el

intestino, especialmente en el grueso, siendo los productos de su metabolismo los que incrementan el volumen de las heces y modifican el metabolismo de la carcinogénesis colorrectal. En cambio, las fibras insolubles presentes en cereales como el trigo o el arroz, no son metabolizadas por la microflora intestinal. La fibra minimiza la posibilidad de sufrir cáncer de colon mediante su elevada capacidad de retención de agua, diluyendo las cantidades de carcinógenos derivados de la dieta y especialmente de promotores tumorales como los ácidos biliares secundarios. También aceleran el tiempo de tránsito intestinal de tal modo que disminuye el tiempo de contacto entre los carcinógenos y la mucosa colónica. Por último, disminuye el pH colónico, lo que puede alterar actividades enzimáticas lumenales, como la inhibición de la 7 $\alpha$ -deshidroxilasa bacteriana responsable de la formación de los ácidos biliares secundarios (Weisburger y col., 1993; Ridlon y col., 2006; Pal y col., 2012). Además, la fibra se considera una fuente importante de energía para la microflora bacteriana. Entre los productos resultantes de la metabolización de la fibra por estas bacterias intestinales se encuentran los ácidos grasos de cadena corta (SCFA, *Short Chain Fatty Acids*). Entre ellos, cabe destacar al butirato que es la principal fuente de energía de los colonocitos, regula la homeostasis colónica y ejerce un efecto protector frente a la carcinogénesis colorrectal, promoviendo la diferenciación y la apoptosis de las células transformadas (Comalada y col., 2006).

### 1.4.2. Componentes del lumen intestinal

Las células del tracto gastrointestinal se encuentran en contacto directo con el contenido del lumen. La correcta homeostasis del epitelio colónico requiere que las células respondan de una forma adecuada a los componentes de ese lumen, entre los que se encuentran los productos de la digestión de los alimentos, ácidos biliares, la microflora intestinal con sus correspondientes antígenos y metabolitos originados gracias a la acción microbiana.

#### *Ácidos biliares*

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas que se sintetizan a partir de colesterol y se conjugan en las células parenquimales del hígado. Después se excretan mediante la bilis al lumen del intestino delgado, donde ayudan a la solubilización y absorción de lípidos, nutrientes y vitaminas liposolubles (Bajor y col., 2010). Además de su importancia en la absorción de lípidos de la dieta así como en la homeostasis del colesterol (Hofmann, 2009), los ácidos biliares están implicados en el control de la

homeostasis de la glucosa hepática, la termogénesis, la homeostasis energética y las respuestas inflamatorias (Miyake y col., 2000; Ma y col., 2006; Thomas y col., 2009).

El ácido cólico (CA, *Cholic Acid*) y el ácido quenodesoxicólico (CDCA, *ChenoDeoxyCholic Acid*), conocidos como ácidos biliares primarios, se sintetizan a partir del colesterol mediante la adición de grupos hidroxilo y la oxidación de la cadena lateral del esteroide para formar un producto final más soluble en agua. Previo a su secreción al lumen canalicular biliar se conjugan con glicocola o taurina, lo que incrementa su solubilidad en agua (Degirolamo y col., 2011). Tras una comida rica en grasas, los ácidos biliares se secretan al duodeno. Casi el 95% de los ácidos biliares secretados son reabsorbidos en el íleon y devueltos al hígado mediante la circulación enterohepática. El 5% restante entra en el colon donde la microflora entérica los metaboliza. Las bacterias intestinales modifican la cadena lateral a través de reacciones de desconjugación y, además, alteran el núcleo esteroídico mediante reacciones de 7 $\alpha$ / $\beta$ -deshidroxilación y epimerización dando lugar a los ácidos biliares secundarios. De esta manera se forman el ácido desoxicólico (DCA, *DeoxyCholic Acid*), el litocólico (LCA, *LithoCholic Acid*) y el ursodesoxicólico (UDCA, *UrsoDeoxyCholic Acid*); siendo este último el más hidrofílico y el LCA el ácido biliar más hidrofóbico. Asimismo, el DCA se absorbe fácilmente en el colon por difusión pasiva no iónica volviendo a formar parte de la reserva de ácidos biliares mientras que sólo una pequeña cantidad del LCA se reabsorbe, excretándose mayoritariamente por las heces (Lefebvre y col., 2009; Degirolamo y col., 2011). En condiciones fisiológicas normales, las concentraciones de ácidos biliares en la parte final del colon son muy pequeñas comparadas con las encontradas en la vesícula biliar (alrededor de 300 mM) o en el intestino delgado (aproximadamente 10 mM). Sin embargo, en humanos con una dieta rica en grasas así como en situaciones patológicas se pueden alcanzar concentraciones tan altas como 1 mM en el ciego o en aguas fecales (700-800  $\mu$ M para el DCA en esta situación) (Stadler y col., 1988; Hofmann, 1999; Longpre y Loo, 2008).

Una dieta rica en grasa aumenta los niveles de ácidos biliares en el lumen colónico, lo que se ha correlacionado con el desarrollo de cáncer colorrectal (Bernstein y col., 2005). Aunque la apoptosis parece ser la respuesta fisiológica normal a la exposición a ácidos biliares, la resistencia a ésta está relacionada con la tumorigénesis. Así, unas altas concentraciones de ácidos biliares secundarios ejercen efectos perjudiciales sobre la arquitectura y la función del epitelio colónico. En primer lugar, generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*; RNS,

*Reactive Nitrogen Species*), cuya producción conduce a un aumento del daño en el DNA y, por lo tanto, a la inducción de mutaciones e inestabilidad genómica, además de perturbar la membrana celular y la mitocondria. También promueven la proliferación celular y la activación de vías de señalización relacionadas con la supervivencia, como NFκB (Bernstein y col., 2009; Pearson y col., 2009). Entre los ácidos biliares secundarios, el DCA y el LCA ejercen efectos tumorigénicos, mientras que el UDCA actúa como un agente citoprotector. De hecho, el UDCA no sólo ejerce efectos antiapoptóticos previniendo la formación de ROS y la translocación de Bax a la mitocondria, sino que también evita la activación de NFκB y la posterior expresión de citoquinas (Pérez y Briz, 2009).

### *Butirato*

Los ácidos grasos de cadena corta son producidos esencialmente en el colon por la fermentación anaeróbica bacteriana de hidratos de carbono no digeridos, como los almidones resistentes y la fibra de la dieta y, en menor medida, a partir de proteínas endógenas y de la dieta. Los principales SCFA producidos en el colon son acético, propiónico, butírico y valérico, ácidos débiles de 2-5 átomos de carbono (Canani y col., 2011). Como productos finales de la fermentación también se producen gases (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>) así como calor (Topping y Clifton, 2001). Las concentraciones molares totales y relativas de los SCFA dependen del sitio de fermentación, la dieta y la composición de la microflora intestinal (Fredstrom y col., 1994). La concentración media puede alcanzar aproximadamente 100mM, donde la proporción media en el lumen colónico es 60% de acetato, 25% de propionato y un 15% de butirato. Como resultado de la fermentación hay un aumento de productos ácidos, reduciéndose el pH en el colon proximal e incrementándose la formación de butirato, ya que se permite el crecimiento de bacterias productoras de butirato para competir contra bacterias Gram (-) que utilizan hidratos de carbono (Guilloteau y col., 2010).

El butirato es la principal fuente de energía de los colonocitos y desempeña un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Roediger, 1982; Hamer y col., 2008). Estimula la proliferación de las células presentes en la base de las criptas colónicas, entre las que se encuentran células madre intestinales y progenitores que están comenzando a diferenciarse (Alrawi y col., 2006; van der Flier y Clevers, 2009). Además, según van migrando las células hacia la parte superior de la cripta, el butirato promueve su diferenciación y, cuando alcanzan la parte más expuesta al



lumen intestinal, promueve su apoptosis, manteniéndose así la adecuada renovación del epitelio colónico (Scheppach y col., 1995). Estos diferentes efectos del butirato dependientes de su localización podrían ser consecuencia de la existencia de un gradiente de concentración de butirato; la mayor concentración se encuentre en la zona de la cripta en contacto directo con el lumen intestinal, mientras que las células de la parte inferior de la cripta se encuentren expuestas a una concentración menor (Csordas, 1996). Por el contrario, en distintas líneas celulares tumorales el butirato ejerce efectos anticarcinogénicos, induciendo apoptosis, inhibiendo la proliferación y promoviendo la aparición de un fenotipo más diferenciado (Hodin y col., 1996; Hinnebusch y col., 2002; Comalada y col., 2006). Aunque no se conocen los mecanismos exactos por los que el butirato influye en la función celular, se considera que es debido a la regulación de la expresión génica causando la inhibición de las histona desacetilasas (HDAC, *Histone DeAcetilases*) (Gibson y col., 1999; Williams y col., 2003; Daly y Shirazi-Beechey, 2006). Por lo tanto, el butirato se considera un agente preventivo e inhibitorio de la carcinogénesis colorrectal.

Los efectos del butirato pueden ser muy variados: incrementa la absorción de NaCl mediante la activación de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (Canani y col., 2004), favorece la acetilación de histonas y de proteínas no histonas, desempeña una función antiinflamatoria modulando la liberación de prostaglandina E2, citoquinas y quimioquinas de las células inmunes (Cox y col., 2009), altera la barrera intestinal induciendo la síntesis de mucinas, la producción de péptidos antimicrobianos y disminuye la permeabilidad entre las uniones estrechas mediante la AMPK (Canani y col., 2011). Asimismo, se ha descrito que el butirato actúa previniendo y mejorando la sintomatología de enfermedades inflamatorias intestinales, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Hamer y col., 2008; De Preter y col., 2011). Se ha descrito también que el butirato ejerce efectos potencialmente terapéuticos a nivel extraintestinal, incluyendo hemoglobinopatías, enfermedades genéticas metabólicas, hipercolesterolemia, resistencia a insulina e isquemia (Canani y col., 2011).

Para que ocurra cualquiera de estos efectos descritos, el butirato producido en el lumen intestinal primero debe entrar en el colonocito. La captura de los SCFA se asocia con el transporte de agua, que es mayor en el colon distal que en el proximal. Se asumió durante bastante tiempo que el principal mecanismo de absorción de los SCFA en el intestino era la difusión no iónica de sus formas protonadas. No obstante,

posteriores estudios demostraron la implicación de transportadores, como intercambiadores  $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$  o  $\text{SCFA}^-/\text{Cl}^-$  (Cook y Sellin, 1998). MCT1 es el principal transportador de los SCFA en el colonocito; aprovechando el gradiente de protones lleva a cabo un cotransporte electroneutro con estequiometría 1:1. El MCT1 se localiza en la membrana basolateral de los enterocitos inmaduros y en el borde en cepillo de células absortivas. Alternativamente, el transporte de butirato puede estar mediado por otras proteínas. Éste es el caso de los intercambiadores de aniones de la familia AE (*Anion Exchanger* o *SLC4*) o las proteínas SLC5A8 (también conocido como SMCT1) y SLC5A12, que co-transportan monocarboxilatos y sodio con una estequiometría 4:1 para los SCFA. El SLC5A8 se expresa en colon, aunque su expresión se reprime en tumores, al igual que ocurre con MCT1, cuya expresión se reduce durante la progresión adenoma-carcinoma (Miyauchi y col., 2004; Borthakur y col., 2006; Borthakur y col., 2010). Este hecho provoca una disminución de la captura de butirato por las células tumorales, lo que podría entenderse como un mecanismo de las células tumorales para escapar de los efectos apoptóticos inducidos por el butirato. La adquisición de esta resistencia al butirato favorece la selección de células alteradas, incrementándose la posibilidad de desarrollar tumores.

Una vez son absorbidos, el butirato puede metabolizarse principalmente en 3 lugares del cuerpo: 1) las células del epitelio colónico emplean el butirato como fuente de energía; 2) el hígado, que utiliza usa el butirato residual y el propionato como sustratos para la gluconeogénesis; 3) en las células musculares donde la oxidación del acetato se emplea para la obtención de energía (Hijova y Chmelarova, 2007).

El butirato es la fuente de energía preferida de los colonocitos. Aproximadamente entre el 70-90% del butirato que entra en la célula se metaboliza (Hijova y Chmelarova, 2007). Una vez dentro de la célula, el butirato pasa al interior de la mitocondria donde tiene lugar la  $\beta$ -oxidación. Es el propio butirato el que actúa sobre la proliferación celular y no los productos derivados de su metabolismo (Leschelle y col., 2000).

### 1.5. EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE HISTONA DESACETILASAS

La habilidad del butirato para influir sobre la función celular se considera que es mayoritariamente debida a la regulación de la expresión génica, concretamente al efecto inhibitorio que ejerce sobre las HDAC (Gibson y col., 1999; Williams y col., 2003; Daly y Shirazi-Beechey, 2006). La actividad de las HAT (*Histone Acetyl Transferases*)

conducen a la hiperacetilación de histonas y, como consecuencia, aumenta la accesibilidad de los factores de transcripción al DNA nucleosomal facilitando la transcripción (Davie, 2003). El butirato puede tener otras dianas intracelulares, incluyendo la hiperacetilación de proteínas no histonas (como p53, E2F1, STAT1, NFκB y Hsp90), alteración de la metilación del DNA, inhibición de la fosforilación de histonas y modulación de la señalización intracelular (Williams y col., 2003; Bolden y col., 2006; Daly y Shirazi-Beechey, 2006).

En eucariotas se han descrito 18 HDAC, que se clasifican en cuatro clases: la clase I, en la que se encuentran las HDAC 1-3 y 8; clase IIa formada por las HDAC 4, 5, 7 y 9; la clase IIb, que incluye a las HDAC 6 y 10; la HDAC11 que pertenece a la clase IV; y la clase III, de las HDAC, también conocidas como sirtuinas, que está formada por siete miembros (Rikiishi, 2011). De entre los SCFA, el butirato es el más efectivo a la hora de inhibir la actividad de las HDAC, con la excepción de las pertenecientes a las clases IIa y III (Davie, 2003).

La activación anómala y desactivación de la transcripción basada en el estatus de acetilación de histonas se ha asociado con tumorigénesis. Distintos estudios han demostrado que las HDAC están asociadas con un número de oncogenes y genes supresores de tumores bien caracterizados que conducen al desarrollo de malignidad (Fukuda y col., 2006; Lin y col., 2006). Curiosamente, las células tumorales son más sensibles a las acciones de los inhibidores de HDAC que las células no transformadas, pero el mecanismo de esta aparente selectividad todavía no es bien entendido (Dashwood y col., 2006; Fukuda y col., 2006). La mayoría de las drogas diseñadas hasta el momento inducen la muerte de un gran número de células sanas, por lo que actualmente se pretende desarrollar quimioterapias que de forma selectiva afecten exclusivamente a las células tumorales.

Estos inhibidores están emergiendo como potentes agentes anticancerígenos que pueden reactivar la expresión génica y restaurar la capacidad de las células malignas para sufrir muerte celular programada. Actualmente se conocen compuestos naturales y sintéticos capaces de inhibir a las HDAC (Tabla II). Ya que todas las isoformas no son inhibidas de la misma manera, estos agentes se dividen en inhibidores específicos de clase I y en paninhibidores (Balasubramanian y col., 2009). Los ácidos hidroxámicos (TSA, SAHA, LAQ824 y CBHA, PDX101 y CRA-026440) son paninhibidores empleados a concentraciones en el rango de nanomolar dirigidos contra las HDAC de clase I, II y IV (Xu y col., 2007). Por el contrario, los ácidos

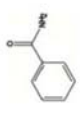
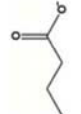
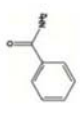
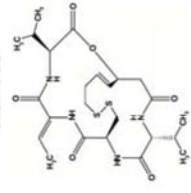
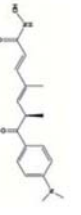
carboxílicos (ácidos valproico y butírico), las benzamidas (MS275, CI-994 y MGCD0103) o los tetrapéptidos cíclicos (trapoxina, depsipéptido y espirocostatina A) son preferentemente los inhibidores de las HDAC específicos de la clase I (Marks y Xu, 2009).


Se cree que los mecanismos de acción de estos inhibidores están relacionados con la expresión génica así como con cambios en proteínas no histonas, mediante la regulación a nivel epigenético o postraducciona, respectivamente. Estos agentes no producen una inducción general de todos los genes, sino que sólo afectan al 5-20% de los mismos; lo que apoya la existencia de elementos de respuesta para estos inhibidores en la región promotora de ciertos genes (Mariadason y col., 2000).

De hecho, se han observado elementos de respuesta en los genes que responden a butirato, identificándose bien una secuencia consenso (GCnGGnnCCA), conocida como elemento de respuesta a butirato (BRE, *Butyrate Response Element*), o bien sitios de unión Sp1/Sp3 o cajas CCAAT, como los responsables de la acción de este agente (Pace y col., 2000; Davie, 2003; Haner y col., 2010).

Aunque el mecanismo de acción de los inhibidores de las HDAC no está totalmente claro, algunos de estos agentes han sido clínicamente validados en pacientes con cáncer. Ya se han aprobado por la FDA (*Food Drug Administration*) dos moléculas para ser empleadas en el tratamiento de linfomas cutáneos de células T: vorinostat (SAHA, *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*, Merck) y romidepsin (depsipeptide, Gloucester Pharmaceutical) en 2006 y 2009, respectivamente. Asimismo están en marcha ensayos clínicos en tumores sólidos y hematológicos en los que están implicados los inhibidores de las HDAC individualmente como en combinación con terapias convencionales (Cea y col., 2011; Kim y Bae, 2011; Lachenmayer y col., 2012).

**Tabla II. Inhibidores de las HDAC.** Actualmente hay unos 15 inhibidores en investigación clínica para enfermedades hematopoyéticas y tumores sólidos, como terapia individual y en combinación con otras drogas. Aquí además se han recogido algunos inhibidores que se han o se están empleando en investigación.

Clase estructural	Compuesto	Potencia	Estado clínico	Dianas	Ref.
<b>Inhibidores específicos de clase I</b> 	Butirato 	mM	No disponible	Clases I y IIa	
	Ácidos carboxílicos Valproato	mM	Antiepiléptico, fase III cáncer cervical y ovario	Clases I y IIa	(Munster y col., 2009) (Warrell y col., 1998)
	Fenilbutirato, bufenil	μM	Aprobado FDA 1996		
	Tributirina		No disponible		
	MS275, entinostat	μM	Fase I y II, leucemia, linfomas y tumores sólidos	HDAC1/2/3	(Saito y col., 1999)
	CI-994, tacedinaline 	μM	Fase I, II, III	HDAC1/2	(Hubeek y col., 2008)
<b>Paninhibidores</b> 	MGCD0103, mocetinostat	μM	Fase I/II en enfermedades hematopoyéticas y tumores sólidos	HDAC clase I y IV, no efecto en II	(Glaser, 2007)
	Trapoxina A	nM	No disponible	HDAC1/4	
	Depsipéptido, FK228, Romidepsin, Istodax	nM	Aprobado FDA 2009 para CTCL, sin efecto sobre tumores sólidos	HDAC1/2	(Piekarz y col., 2009)
	Ácidos hidroxámicos TSA 	nM	No disponible en oncología. Estudios clínicos en enfermedades inflamatorias	Clases I, II y IV	(Adcock, 2007; Halili y col., 2010)

SAHA, vorinostat	nM	Aprobado FDA 2006 (Merck) para formas avanzadas de CTCL. Fase I y II enfermedades hematopoyéticas, sin efecto sobre tumores sólidos	Clases I, II y IV	(Marks y Breslow, 2007)
				
LAQ824, dacinostat	nM	Fase I, II enfermedades hematológicas	Clases I y II	(de Bono y col., 2008)
CBAH	μM	No disponible		
LBH-589, panobinostat	nM	Fase III CTCL, fase I/II en enfermedades hematopoyéticas y tumores sólidos	HDAC1/6	(Zhou y col., 2007)
ITF2357, givinostat	nM	Leucemias refractorias y mielomas, fase II	HDAC clase I y II	(Tan y col., 2010)
PDX101, belinostat	nM	Fase II, varios cánceres y linfoma de célula T	HDAC1/6	(Mackay y col., 2010)
Tubacin	μM	No disponible	HDAC6	(Marks, 2010)
Tubastatina A	nM	No disponible	HDAC6 (> selectividad que tubacin)	
4SC-201, resminostat	μM	Fase II, linfoma Hodgkin y hepatocarcinoma	HDAC1/3/6	(Mandl-Weber y col., 2010)

CBAH: *m*-Carboxycinnamic acid Bis(hydroxamic acid); CTCL: Cutaneous T Cell Lymphoma; SAHA: Suberoylanilide hydroxamic acid; TSA: trichostatin A; FDA: Food and Drug Administration.

## 2. *Objetivos*





4F2hc es una glicoproteína de membrana con un voluminoso dominio C-terminal extracelular. La resolución de la estructura tridimensional del ectodominio de 4F2hc mediante cristalografía confirma su homología estructural con las  $\alpha$ -amilasas. Además, uno de los cristales resueltos da cuenta de la posible homodimerización del ectodominio recombinante. Asimismo, 4F2hc es la cadena pesada de un heterodímero implicado en el transporte de aminoácidos que además es capaz de modular eventos celulares dependientes de la señalización de integrinas  $\beta 1$ . La sobreexpresión de 4F2hc en células normales está asociada a su transformación maligna y, además, está implicada con la progresión tumoral. Por todo ello, se plantean los siguientes objetivos:

- Caracterización estructural/espectroscópica del ectodominio recombinante de 4F2hc para obtener información sobre su estructura dinámica en disolución y sobre su habilidad para formar homodímeros.
- Determinación del papel de 4F2hc en tumorigénesis. Evaluación de la expresión de la proteína en distintas líneas tumorales e implicación de la represión de la expresión de 4F2hc en la progresión tumoral.

Los componentes del lumen intestinal regulan la homeostasis del epitelio colónico. Entre ellos cabe destacar al butirato, producto de la fermentación anaeróbica de la fibra de la dieta, que ejerce un efecto protector frente a la carcinogénesis colorrectal. Inhibe la proliferación e induce la diferenciación y apoptosis de células transformadas. En el lumen también se encuentran los ácidos biliares, necesarios para la solubilización y absorción de lípidos y componentes liposolubles, pero que pueden producir efectos citotóxicos sobre los colonocitos. La adquisición de resistencia a estos efectos apoptóticos/citotóxicos son claves en el desarrollo del cáncer colorrectal. Así que se propone:

- Analizar los mecanismos potencialmente implicados en la adquisición de resistencia a los efectos apoptóticos inducidos por el butirato en células de adenocarcinoma de colon. Evaluar su comportamiento frente a situaciones de estrés y a otros agentes del lumen intestinal como los ácidos biliares.

### 3. *Materiales y Métodos*



## TAMPONES Y MEDIOS DE CULTIVO

### *Tampones para electroforesis y Western blot*

	Composición
<b>TAE</b>	Tris-acetato 40 mM, pH 7,9, EDTA 1 mM
<b>PAGE-SDS:</b>	
<b>Tampón de muestras</b>	Tris 65 mM, pH 6,8, SDS al 3% (p/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol al 0,02% (p/v)
<b>Tampón de desarrollo</b>	Tris 25 mM, pH 8,4, glicocola al 0,14% (p/v), SDS al 0,1% (p/v)
<b>Azul de Coomassie:</b>	
<b>Teñido</b>	Coomassie (Brilliant blue R-250) al 0,25% (p/v), metanol al 50% (v/v), ácido acético glacial al 10% (v/v)
<b>Desteñido</b>	Ácido acético glacial al 7,5% (v/v), metanol al 20% (v/v)
<b>Tampón de transferencia</b>	Tris 48 mM, pH 9,5, glicocola 39 mM, SDS 0,0375% (p/v), metanol al 20% (v/v)
<b>TBS</b>	Tris 20 mM pH 7,6, 137 mM
<b>Tampón de reprobing</b>	Tris 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), β-mercaptoetanol 100 mM

### *Otros tampones y disoluciones*

	Composición
<b>Tampón de aplicación análisis aminoácidos</b>	Citrato sódico 19.61 g/l, HCl conc. 16,50 ml/l, pH 2,2
<b>PBS</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,4 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7 mM, NaCl 130 mM, KCl 5 mM, pH 7,4
<b>Disolución tripsina</b>	PBS, tripsina (1:250) al 0,05% (p/v), EDTA al 0,02% (p/v)
<b>NAR A</b>	Hepes 10 mM, pH 7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM
<b>NAR C</b>	Hepes 20 mM, pH 7,9, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM
<b>Reactivo de Bradford</b>	Coomassie (Brilliant Blue G-250) al 0,01% (p/v) en etanol al 4,75% (v/v), ácido fosfórico al 8,5% (v/v)
<b>Tampón de lisis</b>	Tris 10 mM, pH 8, NaCl 140 mM, TritonX-100 al 2% (v/v)
<b>Tampón MES</b>	MES 25 mM pH 7, 0,15 M NaCl
<b>Tampón PBS/BSA</b>	PBS, azida sódica 0,02% (p/v), BSA al 0,1% (p/v)

En este apartado se recogen las técnicas experimentales empleadas en las que se ha participado de forma directa durante el desarrollo de este proyecto de investigación y las correspondientes al proceso de silenciamiento de la proteína 4F2hc.

### **3.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL ECTODOMINIO DE 4F2hc**

La producción de la proteína recombinante (ectodominio de 4F2hc humano, 4F2hc-ED) se llevó a cabo por el grupo del Dr. Palacín (IRB, Barcelona) (Fort y col., 2007) . Con dicha proteína se procedió a su caracterización espectroscópica empleando las técnicas estructurales que se recogen a continuación.

#### **3.1.1. Cuantificación de la concentración de proteína**

La determinación de la concentración de proteína se realiza mediante análisis de aminoácidos o a través de espectros de absorción UV, una vez determinado el coeficiente de extinción molar.

##### *Análisis de aminoácidos*

Para realizar el análisis de aminoácidos las muestras se secan a vacío y se hidrolizan en 100  $\mu$ l de HCL azeótropo tridestilado 5,7 N que contiene fenol al 0,1% (p/v) y norleucina (17 pmol/ml) como estándar interno. Después de cerrar las hidrólisis en tubos Pyrex a vacío, éstos se mantienen a 110°C durante 24 h. A continuación se abren los tubos, las muestras se llevan a sequedad y se lavan dos veces con 100  $\mu$ l de agua destilada. Los hidrolizados se disuelven en 50  $\mu$ l de tampón de aplicación. Por último, las muestras se transvasan a tubos de teflón, se centrifugan durante 5 min en una microfuga Beckman y se aplican entre 5 y 30  $\mu$ l de las mismas en un analizador automático modelo Biochrom 3000. El integrador automático del sistema permite calcular la concentración de cada aminoácido en el hidrolizado. De esta forma, conocida la composición de aminoácidos de la proteína pura, se puede estimar la concentración de la misma en la disolución inicial teniendo en cuenta el estándar interno de la norleucina.

##### *Medidas de absorción UV*

Los coeficientes de extinción molar se calculan a partir de espectros de absorción de la proteína pura en la región UV-visible. El cálculo de la concentración de

la muestra analizada se realiza mediante análisis de aminoácidos de una alícuota tomada directamente de la cubeta de cuarzo. Los espectros se registran a longitudes de onda ( $\lambda$ ) comprendidas entre 250 y 350 nm, en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y a una velocidad de barrido de 200 nm/min. Las medidas se llevan a cabo en un espectrofotómetro Beckman DU-7. Los espectros obtenidos se corrigen para eliminar el efecto de la absorción aparente debida a dispersión de luz, de manera que se determine a absorción real de la proteína a 280 nm. La absorción aparente producida por la dispersión es inversamente proporcional a la longitud de onda, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$A_{ap} = k/\lambda^n$$

donde  $k$  y  $n$  son constantes. La representación doble logarítmica de la absorción a longitudes de onda superiores a 310 nm frente a la longitud de onda genera una recta, a partir de la cual se obtienen los valores de  $k$  y  $n$ . El espectro de absorción real se calcula por sustracción del valor correspondiente de dispersión a cada longitud de onda al espectro registrado inicialmente. El coeficiente de extinción molar de 4F2hc-ED calculado a 280 nm es  $64.150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### *Método de Bradford*

La concentración de proteína de los extractos celulares se cuantifica mediante el método descrito por Bradford (1976). Este método permite valorar cantidades de proteína comprendidas entre 1 y 10  $\mu\text{g}$  (100  $\mu\text{l}$  de muestra más 1 ml de reactivo), o entre 10 y 100  $\mu\text{g}$  (100  $\mu\text{l}$  de muestra más 5 ml de reactivo), determinándose la absorción a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-640. La medida de absorción se puede realizar 2 min después de hacer la mezcla, y es estable hasta 1 hora. Las rectas de calibrado se realizan empleando albúmina de suero bovino (Sigma) como patrón. El cálculo de la concentración de la disolución de albúmina se realiza a partir del valor de absorbancia a 280 nm del espectro de la proteína sabiendo que el coeficiente de extinción de la albúmina de  $0,66 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **3.1.2. Espectroscopía de emisión de fluorescencia**

Los espectros de emisión de fluorescencia se obtienen empleando un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C equipado con un arco de xenón de 450 W. Las disoluciones de proteína se analizan en cubetas termostatzadas de 0,4 cm de paso óptico de excitación y 1,0 cm de emisión, empleando anchuras de rendija de 4 cm para ambos haces de luz. El voltaje de los canales se ajusta en cada caso de modo que la

señal recibida se encuentre siempre entre los límites aconsejados. En caso necesario se emplean polarizadores de calcita Glan-Thompson que permiten evitar los efectos de dispersión de luz; el polarizador de excitación se orienta horizontalmente ( $90^\circ$ ) y el de emisión verticalmente ( $0^\circ$ ). Las medidas se realizan a  $20^\circ\text{C}$  excitando a 295 nm y recogiendo los espectros de emisión desde 305 a 420 nm, que corresponden a la fluorescencia emitida por residuos de triptófano. A estos espectros se les resta la emisión de fluorescencia de la disolución tampón. En todos los ensayos es necesario determinar la absorción de las muestras a la longitud de onda de excitación, ya que si la absorción a la longitud de onda de excitación supera 0,04 unidades hay que corregir los espectros de acuerdo al efecto de filtro interno.

El apagamiento de la fluorescencia de triptófano por acrilamida se determina a partir de los espectros de emisión de fluorescencia, excitando a 295 nm, en presencia de concentraciones crecientes de acrilamida. Teniendo en cuenta el efecto de dilución y evitando el efecto de filtro interno, se calcula la constante de apagamiento ( $K_{SV}$ ) de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer:  $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$  donde  $F_0$  es la intensidad de fluorescencia en ausencia de apagador y  $F$  la intensidad de fluorescencia a una concentración dada de apagador  $[Q]$  (Lakowicz, 1999).

### **3.1.3. Entrecruzamiento**

El análisis del entrecruzamiento de 4F2hc-ED se realiza utilizando bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3, Pierce) en un exceso 50 molar durante 1 h o bien con glutaraldehído purificado a una concentración final del 0,15% (v/v) durante 5 min, en presencia o ausencia (1 mM EDTA) de  $\text{CaCl}_2$  o  $\text{ZnSO}_4$  en un rango de concentraciones de 10 – 100  $\mu\text{M}$ . La reacción se detiene añadiendo Tris, pH 7,4, a una concentración final de 0,1 M. El posible entrecruzamiento se analiza por PAGE-SDS bajo condiciones reductoras.

## **3.2. TÉCNICAS GENERALES DE CULTIVO CELULAR**

Todas las operaciones que se describen a continuación se realizan en condiciones estériles, en cámara de flujo laminar vertical, y utilizando material estéril. El material plástico procede de las casas Costar y Sarstedt; el material de vidrio se esteriliza en autoclave (Presoclave 75, Selecta) a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 min. El medio de cultivo empleado es medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene 4,5

g/l de glucosa y 110 mg/l de piruvato (Sigma). En el caso del PBS, éste se prepara usando agua ultrapura (Milli-Q, Millipore) y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

### **3.2.1. Cultivo celular, subcultivos y criopreservación de células**

Las células (Tabla III) se cultivan de forma rutinaria en medio DMEM suplementado con un 5% (v/v) de suero fetal bovino descomplementado (10% en el caso de las células HeLa), 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina (medio completo), y se mantienen a 37°C en una atmósfera saturada de humedad compuesta por un 95% de aire y un 5% CO<sub>2</sub> (incubador de CO<sub>2</sub> de Nuaire, modelo DH Autoflow). El suero fetal bovino, la mezcla penicilina/estreptomycin (20.000 U/ml y 20.000 mg/ml, respectivamente) y la disolución de glutamina (200 mM) son de Bio-Whittaker. La descomplementación del suero se realiza por tratamiento durante 1 h a 56 °C en un baño de agua termostatzado.

La evolución de los cultivos se comprueba diariamente chequeando la metabolización del medio de cultivo a través de la observación visual del color del medio (dotado de rojo fenol como indicador de pH) y controlando el estado de la monocapa celular, que se examina mediante microscopía de contraste de fase (microscopio de óptica invertida Nikon TMS). En función de estos parámetros, el medio de cultivo se cambia habitualmente cada dos o tres días.

Cuando el número de células por superficie de crecimiento es lo suficientemente elevado, o cuando las células han alcanzado la confluencia, se procede a su subcultivo. Para ello, la monocapa celular se lava con PBS y las células se liberan de la superficie de crecimiento por tripsinización con una disolución de tripsina, preparada a partir de un *stock* comercial de tripsina-EDTA (Biological Industries). El cultivo celular se mantiene a 37°C controlándose el proceso de liberación de las células de la superficie de cultivo por observación al microscopio. Las células que se van liberando, se recogen en un tubo estéril que contiene medio de cultivo completo con el fin de inactivar la tripsina con el inhibidor de tripsina presente en el suero fetal bovino. De esta manera se evita una exposición excesiva del cultivo a esta enzima, lo que podría provocar daños celulares. La suspensión celular obtenida se centrifuga a 1.200 rpm (centrífuga MPW-223e) durante 10 min, y el sedimento se resuspende en un volumen apropiado de medio de cultivo completo. A continuación, las células se



siembran en nuevos frascos de cultivo para su propagación, o se preparan, de forma adecuada, para los distintos tipos de ensayos.

El número de células se determina mediante recuento celular en cámara de Neubauer (Brand). Para ello, una vez tripsinizadas, las células se recogen por centrifugación a 1.200 rpm y se resuspenden en medio de cultivo completo. La

**Tabla III. Líneas celulares empleadas en los estudios.**

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS
BCS-TC2	Adenocarcinoma de colon humano	Poco diferenciadas y no tumorigénicas (Turnay y col., 1990)
BCS-TC2.2	Obtenidas de tumores generados en ratones atímicos al coinyectar células BCS-TC2 con matrigel	Poco diferenciadas y tumorigénicas (López-Conejo y col., 1996)
BCS-TC2.BR2	Selección a partir de células BCS-TC2 mediante cultivo continuado en presencia de butirato 2 mM	Diferenciadas y tumorigénicas (López de Silanes y col., 2004)
BCS-TC2.FN	Establecida a partir de tumores generados por inyección de BCS-TC2 + fibronectina (FN)	Tumorigénicas y diferenciadas (López-Conejo y col., 2002)
BCS-TC2.LNi	Parte interna tumor subcutáneo inducido por la inyección de BCS-TC2 + laminina (LN) (diferenciadas)	Células establecidas por el grupo. Tumorigénicas
BCS-TC2.LNe	Parte externa tumor subcutáneo inducido por la inyección de BCS-TC2 + LN (poco diferenciadas)	
BCS-TC2.FNH	Tumores hepáticos obtenidos tras inyección BCS-TC2 + FN en bazo (más tumorigénicas que las parentales)	
BCS-TC2.2MGH	Tumores hepáticos obtenidos tras inyección BCS-TC2.2 + matrigel en bazo (menos tumorigénicas que las parentales)	
Caco-2	Adenocarcinoma colorrectal humano	ATCC HTB-37 Tumorigénicas

Tabla III (cont.). Líneas celulares empleadas en los estudios.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS
Colo320	Adenocarcinoma colorrectal humano (estadio C, clasificación Dukes)	ATCC CCL-220.1 Crecimiento en suspensión, tumorigénicas
FHC	Células fetales humanas derivadas de epitelio colónico	ATCC CRL-1831
SW1417	Adenocarcinoma colorrectal humano (estadio C, clasificación Dukes)	ATCC CCL-238 No tumorigénicas
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix humano	ATCC CCL-2 Tumorigénicas
4F2 C-13	Hibridoma productor de anticuerpos anti-4F2 (IgG2ak)	ATCC HB-22
MCF-7	Carcinoma de mama humano	ECACC Tumorigénicas
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovario humano	ATCC HTB161 Tumorigénicas
A431	Carcinoma epidermoide de piel humano	ATCC CRL1555 Tumorigénicas
RD	Rabdomiosarcoma humano	ATCC CCL136 Tumorigénicas

suspensión celular homogénea se deposita en ambas cámaras del hemocitómetro con la ayuda de una pipeta Pasteur y se determina el número de células al microscopio, calculándose, mediante las conversiones pertinentes, el número de células por mililitro de la suspensión original.

Para la conservación del cultivo, las células se tripsinizan al final de la fase exponencial y se recogen por centrifugación. Las células se resuspenden en suero fetal bovino al 100% (v/v) y, posteriormente, se añade dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (v/v) como agente criopreservante. La suspensión se transfiere a viales estériles de polipropileno de 2 ml de capacidad para proceder a su congelación. Para conseguir que la temperatura descienda a una velocidad de 1°C/min, los viales se introducen en un

recipiente de plástico con alcohol isopropílico (Nalgene) y éste en el congelador de -80 °C. Dos días después se transfieren a un contenedor con nitrógeno líquido (-196°C; recipiente Locator 8, Thermolyne) donde las células se almacenan.

El proceso de descongelación se realiza de forma rápida y se transfiere el contenido de los viales a tubos de centrifuga preparados con 10 ml de medio de cultivo completo, consiguiendo de este modo diluir la concentración de DMSO que puede resultar tóxico para las células. Posteriormente, las células se recogen por centrifugación y se resuspenden en medio de cultivo completo a la densidad celular requerida para su siembra en las correspondientes botellas o placas de cultivo.

### **3.2.2. Tratamiento de las células con distintos agentes**

#### *Inhibición de la glicosilación*

La tunicamicina es un inhibidor específico de la N-glicosilación que bloquea el primer paso de la síntesis de glicoproteínas y, por lo tanto, inhibe la síntesis de todas las N-glicoproteínas. Concretamente, en el retículo endoplasmático inhibe a la N-acetilglucosamina fosfotransferasa que cataliza la transferencia de UDP-N-acetilglucosamina al dolicol-fosfato en la primera etapa de la biosíntesis de glicoproteínas. Se prepara una disolución *stock* de tunicamicina (Sigma) a 1 mg/ml en medio DMEM.

#### *Inhibidores de histona-desacetilasas*

El butirato sódico (Sigma) se prepara a una concentración 40 mM disuelto en medio DMEM completo, se esteriliza por filtración a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (BioTech), y se conserva a 4°C hasta el momento de su utilización. En cada ensayo se añade el volumen adecuado de la disolución *stock* en medio DMEM completo hasta alcanzar la concentración final de butirato deseada. Por otro lado, se prepara una disolución *stock* de la tricostatina A [TSA; ácido 4,6-dimetil-7-(p-dimetilaminofenil)-7-oxohepta-2,4-dieno-hidroxámico; Sigma] 10 mM en DMSO o bien, de SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida; Cayman Chemical) 20mM en DMSO. Ambos *stocks* se mantienen a -20°C hasta el momento de su utilización. En cada ensayo se añade un volumen adecuado de la disolución *stock* en medio DMEM completo, manteniendo una concentración final de DMSO no superior al 0,005% (v/v).

*Inhibidores/activadores de rutas de señalización*

Como inhibidores de p38, ERK o JNK-MAPK se emplean los compuestos SB203580 (4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole; Sigma), PD98059 (2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one; Sigma), SP600125 (1,9-pyrazoloanthrone; Sigma), respectivamente. De todos los inhibidores se prepara una disolución *stock* en DMSO y ésta se conserva a -20°C hasta el momento de su utilización. En los ensayos en los que se emplean inhibidores, las células se pretratan durante 2 h con los mismos, a no ser que se indique lo contrario.

**3.2.3. Obtención de extractos totales y extractos nucleares y citoplasmáticos**

La recogida de las células se realiza por raspado de los cultivos tras el tratamiento concreto al que han sido sometidas. Las células se lavan con PBS y se centrifugan a 1.800 rpm durante 10 min. El sedimento celular final se resuspende en el volumen adecuado de tampón de lisis, al que se adicionan inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina A 1 nM, leupeptina 1 µg/ml, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 nM, NaF 1nM, β-glicerofosfato 1 nM y ditiotreitól 1 mM). Esta suspensión celular se pasa al menos 10 veces a través de una aguja de 0,5 x 16 mm y se centrifuga nuevamente durante 10 min a 13.000 rpm con el fin de eliminar el material celular no solubilizado. El sedimento se descarta y el sobrenadante se conserva a -20°C hasta su utilización.

En el caso de los extractos nucleares y citoplasmáticos, tras raspar y recoger las células, éstas se resuspenden en tampón de lisis hipotónico NAR A con los inhibidores de proteasas y fosfatasas antes detallados. Las células se incuban en este tampón durante 10 min en hielo y, a continuación, se añade Nonidet P-40 a una concentración final del 0,1% (p/v). Tras 3 min a temperatura ambiente las células se agitan en vórtex y la fracción citosólica se obtiene por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. El precipitado así obtenido contiene los núcleos que se resuspenden en tampón de extracción hipertónico NAR C con inhibidores de proteasas y fosfatasas. La suspensión de núcleos se agita durante 1 h a 4°C y se obtiene el extracto nuclear tras centrifugar 5 min a 13.000 rpm. Los extractos nuclear y citoplasmático se conservan a -80°C.

**3.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS GENERALES****3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)**

La polimerización de los geles de poliacrilamida, así como el desarrollo de la electroforesis, se llevan a cabo en un equipo Mini-Protean de Bio-Rad con geles de 0,75

o 1,5 mm de espesor, 7 cm de alto y 8 cm de ancho. Se emplean tanto sistemas de 10 como de 15 pocillos. La electroforesis se desarrolla en un sistema discontinuo, de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970) .

Las muestras para electroforesis se preparan disolviéndolas en tampón de muestras PAGE-SDS, o bien, si las muestras están en disolución, añadiendo una tercera parte de tampón de aplicación tres veces concentrado. El azul de bromofenol se emplea como referencia del desarrollo de la electroforesis al migrar con el frente durante la misma. En caso necesario se puede añadir al tampón de aplicación  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% (v/v) como agente reductor. Las muestras de electroforesis se desnaturalizan por calentamiento a 95°C durante 5 min antes de su aplicación. Además se emplea un patrón de proteínas de masas moleculares conocidas, que permite la determinación de la masa molecular.

La electroforesis se lleva a cabo en el tampón de desarrollo PAGE-SDS a una intensidad de corriente constante (25 mA/gel) suministrada por una fuente Bio-Rad 1000/500, deteniéndose al alcanzar el azul de bromofenol el extremo inferior del gel.

Tras el desarrollo de la electroforesis la detección de proteínas se lleva a cabo por inmersión del gel durante 15 min en la disolución de teñido con azul de Coomassie que, además, fija las proteínas al contener metanol y ácido acético. El exceso de colorante se elimina por sucesivos lavados en la disolución de desteñido.

### **3.3.2. Transferencia e inmunodetección (*Western blot*)**

La transferencia electroforética se realiza básicamente según el procedimiento descrito por Towbin y col. (1979). Tras el desarrollo de la electroforesis en las condiciones anteriormente descritas, los geles, así como las membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL; Amersham) y las láminas de papel 3 mm (Whatman), se equilibran durante 10 min en tampón de transferencia. La transferencia se lleva a cabo utilizando un equipo de transferencia (SV20-SDB, Sigma-Aldrich), aplicándose una intensidad de corriente constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de gel durante aproximadamente 1 h hasta conseguir la transferencia total de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa, que se comprueba mediante el empleo de patrones de masa molecular preteñidos con azul de *Coomassie* (BioRad).

Finalizada la transferencia, la membrana se satura por incubación a temperatura ambiente durante 1 h con tampón TBS (*T*ris *B*uffer *S*aline) que contiene Tween 20 al 0,1 % (v/v) y leche deslipidizada al 5% (p/v). A continuación, se incuba

durante 1 h a temperatura ambiente, o bien 18 h a 4°C, con el anticuerpo correspondiente diluido en TBS-Tween-20 al 0,1% (v/v). Posteriormente, la membrana se lava exhaustivamente con ese mismo tampón. La incubación con el correspondiente segundo anticuerpo, marcado con peroxidasa, se lleva a cabo durante una hora a temperatura ambiente en TBS a la dilución adecuada. Tras un lavado en condiciones idénticas a las del primer anticuerpo, el revelado se realiza utilizando el *kit* comercial de ECL (*Enhanced ChemiLuminescence*; Amersham) basado en la emisión de luz por la oxidación de luminol (una diacilhidrazida cíclica) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por la peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo. Ésta se detecta en un detector LAS-3000 (Fujifilm) y las imágenes se densitometran utilizando el software Multi Gauge v3.0 de la misma compañía, que proporciona el “volumen” de las bandas de acuerdo a la intensidad de las mismas, obteniéndose los correspondientes volumogramas.

Los anticuerpos y las diluciones utilizadas, así como la procedencia de cada uno de ellos, se recogen en la Tabla IV.

En algunos casos las membranas se pueden reutilizar para llevar a cabo la inmunodetección de otras proteínas. Para ello, la membrana de nitrocelulosa se sumerge en tampón de *reprobing* durante 30 min a 50°C. Tras la retirada del tampón y posterior lavado exhaustivo de la membrana con TBS, se procede nuevamente con el protocolo de detección con anticuerpos a partir de la saturación con leche deslipidizada. Además, se emplean anticuerpos frente a alguna proteína cuya expresión permanece invariable, en el modelo de estudio, durante los diferentes tratamientos que se llevan a cabo. Con ello, se obtiene un valor de referencia que permite la normalización de las intensidades de las bandas de proteína.

**Tabla IV. Relación de anticuerpos empleados en el trabajo.**

ANTICUERPO	ANTÍGENO	TIPO, USO Y DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-CD98 (C-20)	4F2hc (85 kDa)	GpAb, WB 1/200	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-4F2hc FG1/8	4F2hc (85 kDa)	mAb, FC, IF 50µl ascites	Proporcionado por el Dr. Sánchez Madrid
Anti-4F2 C13 (HB-22)	4F2hc (85 kDa)	mAb, FC 1/20 IP*	ATCC HB-22
Anti-CD29	Integrina $\beta 1$ (130 kDa)	mAb, WB 1/5000	BD Transduction Laboratories
Anti-CD29 TS2/19	Integrina $\beta 1$	mAb, FC, IF 50 µl ascites	Proporcionado por el Dr. Sánchez Madrid
Anti-integrina $\beta 1$ A1B2	Integrina B1	RatmAb, IF 1/10	Banco de hibridomas AC Universidad de Iowa
Anti-EMMPRIN	EMMPRIN (55 kDa isoforma glicosilada y 30 kDa la no glicosilada)	RpAb, WB 1/100	Zymed
Anti-CD147 (MEM-M6/1)	EMMPRIN (42 kDa)	mAb, WB 1/1000 IP*	Abcam
Anti- EMMPRIN (8D6)	EMMPRIN (55 kDa, glicosilada)	mAb, IF, FC 1/100	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-galectina-3 (H-160)	Galectina-3 (31 kDa)	RpAb, WB 1/200 IP*	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-MMP-2 (Ab-3)	MMP-2 (72 kDa)	mAb, WB 1/100	Calbiochem
Anti-MMP-9 (Ab-1)	MMP-9 (92 kDa)	mAb, WB 1/50	Calbiochem
Anti-E-cadherina	E-cadherina (120 kDa)	mAb, WB 1/400	Zymed Laboratories
Anti-fosfo-Akt (193H12)	pAkt (Ser473)	RmAb, WB 1/1000	Cell Signalling
Anti-Akt	Akt (21 kDa)	RpAb, WB 1/1000	Cell Signaling
Anti-fosfo-p44/42MAPK	Fosfo-p44/42 (T202/Y204)	RpAb, WB 1/1000	Cell Signaling
Anti-p44/42MAPK	p44/42 (44 y 42 kDa)	RpAb, WB 1/1000	Cell Signaling
Anti-fosfo FAK	Fosfo-FAK (Y397)	RpAb, WB 1/1000	Cell Signaling
Anti-FAK	FAK (125 kDa)	RpAb, WB 1/1000	Cell Signaling
Anti-fosfo GSK3 $\beta$	GSK3 $\beta$ (Ser9)	RpAb, WB 1/1000	Thermo Scientific
Anti-GSK3 $\beta$	GSK3 $\beta$ (Ser9) 47kDa	RpAb, WB 1/1000	Thermo Scientific
Anti- $\beta$ -catenina	B-catenina (92 kDa)	mAb, WB 1/500	BD Transduction Laboratories

Tabla IV (cont.). Relación de anticuerpos empleados en el trabajo.

ANTICUERPO	ANTÍGENO	TIPO, USO Y DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-p38MAPK	<i>p38-MAPK (43 kDa)</i>	RpAb, WB 1/1000	Cell Signaling
Anti-fosfo-Histona H2AX (20E3)	<i>Fosfo-Histona H2AX (S139)</i>	RmAb, WB 1/1000	Cell Signaling
Anti-H2AX	<i>Histona H2AX (15 kDa)</i>	RpAb, WB 1/1000	Cell Signaling
p21 (C-19)	<i>p21 (21 kDa)</i>	RpAb, WB 1/200	Cell Signaling
p53 Ab-6 (Clone DO-1)	<i>p53 (53 kDa)</i>	mAb, WB 1/500	Thermo Scientific
Anti-vinculina (clon hVIN-1)	<i>Vinculina (116 kDa)</i>	mAb, WB 1/3000	Sigma
Anti-IgG de ratón (Control)	<i>IgG de ratón</i>	Ratón	ProSci
Anti-IgG de ratón-FITC	<i>IgG de ratón</i>	Burro, IF 1/100	Conjugado con FITC Jackson Immnoresearch Laboratories
Anti-IgG de ratón-TR	<i>IgG de ratón</i>	Burro, IF 100	Conjugado con Texas Red Jackson Immnoresearch Laboratories
Anti-IgG de ratón-PE	<i>IgG de ratón</i>	Cabra, FC 1/500	Conjugado con R-Ficoeritrina Molecular Probes (Invitrogen)
Anti-IgG de ratón-Alexa Flúor 647	<i>IgG de ratón</i>	Burro, FC, IF 1/500	Conjugado con Alexa Flúor 647 Molecular Probes (Invitrogen)
Anti-IgG Rata-FITC	<i>IgG de rata</i>	Burro, IF 1/100	Conjugado con FITC Jackson Immnoresearch Laboratories
Anti-IgG de cabra-TR	<i>IgG de cabra</i>	Burro, IF 1/100	Conjugado con Texas Red Jackson Immnoresearch Laboratories
Anti-IgG de cabra-HRP	<i>IgG de cabra</i>	Rabbit, 1/40000	Conjugado con peroxidasa Jackson Immnoresearch Laboratories
Anti-IgG de conejo-HRP	<i>IgG de conejo</i>	Cabra, 1/3000	Conjugado con peroxidasa Bio-Rad
Anti-IgG de ratón-HRP	<i>IgG de ratón</i>	Cabra, 1/5000	Conjugado con peroxidasa Pierce

WB, Western blot; IP\*, inmunoprecipitación (5µg anticuerpo); IF, inmunofluorescencia; FC, citometría de flujo. mAb: anticuerpo monoclonal obtenido en ratón; RmAb: anticuerpo monoclonal obtenido en conejo; RpAb: anticuerpo policlonal obtenido en conejo; GpAb: anticuerpo policlonal obtenido en cabra; RatmAb: anticuerpo monoclonal de rata.



### 3.4. SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE 4F2hc

La represión estable de la expresión de 4F2hc se lleva a cabo mediante miRNA empleado un sistema de vectores lentivirales derivados del HIV. El trabajo con vectores lentivirales se realiza en condiciones estándar de bioseguridad de nivel 2, según las normas de la 4ª edición del “CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories” (U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health, 1999). En este caso se trabaja en la sala de cultivos de los Servicios Científicos Comunes del Parque Científico de Barcelona.

#### 3.4.1. Diseño y clonación del miRNA

El diseño del miRNA artificial se realiza a partir de la secuencia del mRNA de 4F2hc (número de acceso NCBI: NM\_001013251) mediante el software BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen, Life Technologies). Esta herramienta informática proporciona las secuencias de dos oligonucleótidos complementarios que contienen la secuencia del miRNA 947 (5'-TCGGGACATAGAGAATCTGAA-3') o bien la del miRNA 1087 (5'- CCAACAAAGACTTGCTGTTGA-3'). Ambas cadenas se hibridan para formar un dúplex (pre-miRNA) de unos 60 bp con extremos 5' protuberantes (TGCT), lo que permite dirigir su clonación. Estos pre-miRNA (42,86% GC; ORF, *Open Reading Frame*) contienen a continuación una G, la secuencia del miRNA maduro (secuencia diana complementaria, *antisense*), seguido por un espaciador de 19 nucleótidos (para formar el *loop* terminal) y la secuencia diana (*sense*) del miRNA con 2 nucleótidos eliminados (nucleótidos 9-10) para crear un *loop* interno (Figura 7).



**Figura 7. Secuencia de los oligonucleótidos complementarios que contienen la secuencia de los miRNA 947 y 1087.** Formación del pre-miRNA tras la hibridación de ambas hebras. Los oligonucleótidos se muestran apareados tal y como estarían en el pre-miRNA.

La clonación del pre-miRNA se realiza en el vector de expresión pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR, incluido en el BLOCK-iT™ Pol II miR Expression Vector kit (Invitrogen, Life Technologies). Este vector permite la expresión constitutiva del pre-

miRNA bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (CMV) que es regulado por la RNA polimerasa II. Además, contiene la secuencia específica TGCTG, que, a parte de ser complementaria a los extremos 5' protuberantes del pre-miRNA y por tanto dirigir su clonación, flanquea la secuencia permitiendo el adecuado procesamiento del miRNA, ya que deriva de la secuencia del miRNA endógeno murino miR-155. La inserción del pre-miRNA ocurre en la región 3' que no se traduce (UTR, *untranslated*) de la secuencia de la proteína fluorescente verde esmeralda (EmGFP, *Emerald Green Fluorescence Protein*), lo que permite la expresión concomitante de ambos, resultando en una fuerte correlación entre la expresión de la EmGFP y la represión de la expresión de 4F2hc mediada por el miRNA. Como control negativo se emplea el vector de expresión pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-neg que contiene un inserto que es capaz de formar una estructura en horquilla como cualquier pre-miRNA, pero no está dirigido hacia ningún gen conocido de vertebrados (Invitrogen, Life Technologies).

#### 3.4.2. Clonación en vectores lentivirales

Para lograr la expresión estable del miRNA en las células, estos *cassettes* de expresión (EmGFP-pre-miRNA o EmGFP-control negativo) se transfieren a un vector lentiviral mediante la tecnología *Gateway* (Invitrogen, Life Technologies). Este método universal de clonación se basa en dos reacciones de recombinación entre sitios específicos de recombinación del bacteriófago lambda (Landy, 1989). Los vectores proporcionados con el *kit* tienen los sitios de recombinación *att* (*attachment recognition sites*) apropiados facilitando la transferencia de DNA entre ellos. La enzima BP clonasa, que contiene la integrasa y el factor de integración del hospedador (IHF, *Integration Host Factor*), cataliza la recombinación entre los sitios *attB* que flanquean los casetes en el vector de expresión pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR y los sitios *attP* presentes en el vector donante pDONR221, generando lo que se conoce como clon de entrada (*entry clone*). Esta construcción actúa como intermediaria, siendo sustrato junto al vector de destino de una segunda reacción de recombinación llevada a cabo por la LP clonasa (integrasa, IHF y la excionasa Xis) entre los sitios *attL* y *attR* (en el *entry clone* y el vector de destino, respectivamente). El vector de destino es el vector lentiviral pLenti6/V5-DEST. Este plásmido contiene los elementos requeridos para el empaquetamiento de la construcción en viriones (5' y 3' LTR, señal de empaquetamiento, etc.) y el marcador de resistencia a blasticidina, bajo el control del promotor del SV40, para la selección de

líneas celulares establemente transducidas. De este modo se genera el clon de expresión en el que se ha transferido el *cassette* que contiene la EmGFP y el pre-miRNA al vector lentiviral que se emplea para la producción de lentivirus. El mismo proceso se realiza en paralelo para obtener el clon de expresión del control negativo (denominado a partir de aquí como *scramble*).

El apareamiento de los oligonucleótidos y la clonación en los distintos vectores se lleva a cabo siguiendo las instrucciones y protocolos indicados por el fabricante (Invitrogen, Life Technologies).

### **3.4.3. Preparación de partículas lentivirales**

#### *Producción de partículas lentivirales*

Una vez obtenidos los vectores lentivirales que contienen los *cassettes* de los miRNA de interés, se producen las partículas lentivirales que permitirán su integración en el genoma de la célula y, por lo tanto, su expresión de forma estable.

Para ello, se cotransfectan células empaquetadoras HEK293T (80-90% de confluencia) con el vector lentiviral que contiene el pre-miRNA de interés (20 µg) junto con los plásmidos pMD2G (6 µg) y pCMVδR8.74 (14 µg), que contienen los genes necesarios para la síntesis de las proteínas de la envuelta (pertenecientes al virus heterólogo de la estomatitis vesicular, VSV) y para las implicadas en el empaquetamiento del HIV, respectivamente. La transfección se lleva a cabo por el método del fosfato cálcico durante 12-20 h a 37°C. Después se cambia el medio de cultivo y las células se incuban a 33°C durante 24 h (temperatura a la que los lentivirus son más estables). El medio de cultivo se recoge durante los dos días siguientes al cambio de medio, se centrifuga a 2.400 rpm para eliminar células flotantes y se filtran usando filtros de 0,45 µm (Renner).

#### *Purificación y concentración de lentivirus*

A continuación, las partículas virales recogidas en el medio de cultivo se concentran mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Unos 4 ml de sacarosa estéril al 20% (p/v) se colocan en el fondo de un tubo cónico de ultracentrífuga y, sobre este colchón, se añade cuidadosamente el medio que contiene las partículas víricas y se centrifuga a 26.000 rpm durante 2 h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman. Una vez transcurrido este tiempo, se aspira la parte superior del sobrenadante y el resto se retira por decantación, dejando secar el sedimento.

Cuando está seco, se resuspende en 75-200 µl de medio de cultivo sin suero, se alícuota y se congela a -80°C.

#### 3.4.4. Titulación de las partículas virales e infección

La titulación de las partículas virales se realiza en las líneas celulares en las que se pretende obtener el silenciamiento de 4F2hc (HeLa, BCS-TC2, BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.2). Se siembran placas de 6 pocillos con 3-5x10<sup>4</sup> células por pocillo y, tras 2 días, se infectan las células con distintas diluciones de las partículas virales en medio de cultivo completo o sin diluir. Tras 24 h se cambia el medio de cultivo; 3 días después, las células se lavan con PBS y se tripsinizan (250 µl tripsina por pocillo), añadiéndose 1 volumen de paraformaldehído al 3% (v/v) para fijar e inactivar las partículas víricas que puedan quedar libres. El grado de infección de las células se valora por citometría de flujo en función de la expresión de EmGFP.

El cálculo del título se realiza aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{TU/ml} = [\text{n}^\circ \text{ células} \times (\% \text{ células GFP}^+ / 100)] / V$$

donde TU corresponde a las unidades de transducción (*transducing units*) y V al volumen en mililitros de la suspensión viral empleada.

Se seleccionan las diluciones de la suspensión viral que proporcionan un porcentaje de células positivas para GFP entre el 5- 20%, ya que, porcentajes superiores al 20% incrementan la probabilidad de encontrar células infectadas por dos partículas virales.

#### 3.4.5. Transducción de las células

Una vez conocida la infectividad, se transducen las líneas celulares (HeLa, BCS-TC2, BCS-TC2.BR2, BCS-TC2.2) con las partículas virales con el fin de que el *cassette* que contiene el pre-miRNA (en el genoma vírico recombinante) se transfiera e integre en el genoma celular, logrando de este modo la expresión estable del miRNA.

La infección se realiza empleando las partículas virales (947, 1087 o *scramble*) tal y como se describe en el apartado anterior (sección 4.4), con la excepción de que 2 h antes se añade *polybrene* (8 µg/ml), polímero catiónico que incrementa la eficiencia de infección por retrovirus. En el caso de las células de adenocarcinoma de colon se utilizan valores de multiplicidad de infección (MOI, *multiplicity of infection*: n° partículas víricas/n° de células) de 1 o 2 para maximizar la represión de 4F2hc, ya que son más difíciles de transducir que las células HeLa. Cuando las células están confluentes se tripsinizan, se analizan por citometría de flujo y en función de si

expresan EmGFP o no, se seleccionan mediante FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Una vez separadas, se seleccionan las células transducidas establemente por cultivo con blasticidina (6 µg/ml) durante 2 semanas, ya que el vector lentiviral contiene el gen de resistencia a este antibiótico. Sin embargo, se ha comprobado que las células BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.2 son muy sensibles a este agente, llegado incluso a causar su muerte, por lo que en este caso se realiza exclusivamente la selección de acuerdo a la expresión de EmGFP.

La represión de la expresión de 4F2hc se comprueba mediante *Western blot*, citometría de flujo y microscopía confocal.

### **3.5. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN CELULAR**

#### **3.5.1. Ensayos de adhesión celular**

Con el fin de estudiar la influencia de la matriz extracelular en el comportamiento celular, se recubren las placas de cultivo con componentes individuales de la misma, como fibronectina o laminina. Las proteínas de la matriz extracelular se disuelven a la concentración requerida para cada ensayo (5-20 µg/ml) en PBS que contiene kanamicina (50 µg/ml) (PBS/kanamicina). Se depositan 100 µl de estas disoluciones en placas de 96 pocillos (0,32 cm<sup>2</sup> de superficie/pocillo), incubándose 18 h a 4°C. Después de lavar tres veces las placas con PBS/kanamicina, los sitios de unión de proteína no saturados se recubren empleando una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% (p/v) en el mismo tampón, incubándose 2 h a 37°C. Por último, las placas se vuelven a lavar con tampón y se utilizan inmediatamente. Las disoluciones de fibronectina y laminina se preparan en PBS a partir de *stocks* 1 mg/ml o 0,43 mg/ml, respectivamente. En todos los casos, como control se emplean células sembradas en pocillos saturados sólo con albúmina.

Las células se recogen por tripsinización de los cultivos correspondientes, se centrifugan y resuspenden en medio de cultivo completo. Se mantienen en suspensión en este medio al menos durante 30 min a 37°C para permitir la reconstitución de la membrana plasmática tras el proceso de tripsinización. Las células se centrifugan y resuspenden en medio libre suero a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml, y se depositan 100 µl de la suspensión celular en cada pocillo de las placas de 96 pocillos tapizadas con la proteína. Transcurrido el tiempo adecuado se determina el número de células adheridas mediante el método colorimétrico descrito por Busk y col. (1992). Después de retirar el medio de cultivo, la monocapa celular se lava tres veces con PBS para

eliminar las células no adheridas. Las células adheridas se fijan con una mezcla fría acetona:metanol (1:1; v/v) durante 10 min a 4°C y se lavan tres veces con agua destilada. A continuación, las células se tiñen durante 30 min a temperatura ambiente con cristal violeta al 0,5% (p/v) en metanol al 20% (v/v), añadiendo 80 µl/pocillo. Posteriormente, se lava con agua destilada para retirar el colorante no fijado en las células. El colorante se solubiliza mediante la adición de 100 µl de SDS al 0,5% (p/v) en agua destilada. Después de incubar 30 min a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA (Titertek Uniskan II). Los resultados se expresan en unidades de absorbancia con respecto al blanco, considerando como tal la absorbancia de pocillos preparados en idénticas condiciones pero en ausencia de células. En cada caso se resta el control de adhesión, absorbancia de células adheridas inespecíficamente a pocillos recubiertos con BSA.

### **3.5.2. Ensayo de extensión celular**

Las células se siembran sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro previamente saturados con 5 µg/ml de laminina o fibronectina en DMEM con 1% (p/v) BSA como describen Liu y col. (1999). Transcurrida 1 h a 37 °C, los cubreobjetos se lavan con un tampón PIPES 100 mM pH 6,8, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> (tampón PEM) al que se le añade polietilenglicol (PEG, Sigma) al 4% (v/v). Seguidamente, las células se permeabilizan con tampón PEM que contiene Triton X-100 al 0,5% (v/v) durante 90 s a temperatura ambiente. Las células se vuelven a lavar con tampón PEM/PEG y se fijan con tampón PEM que contiene p-formaldehído al 3,7% (v/v) y DMSO al 1% (v/v) durante 30 min a temperatura ambiente. Después se lavan con PBS y se procede a la tinción del citoesqueleto. Los cubreobjetos fijados se saturan durante 20 min a temperatura ambiente con BSA al 1% (p/v) en PBS. Se lavan 3 veces con PBS y se incuba con un anticuerpo monoclonal anti-β tubulina I durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Tras la incubación se lava con PBS y se añade el anticuerpo secundario anti-ratón IgG obtenido en burro marcado con Texas Red, incubándose durante 45 min a 37°C en cámara húmeda y en oscuridad. Las preparaciones se montan en un portaobjetos empleando el conservante de la fluorescencia ProLong Gold (Invitrogen). Las muestras se guardan a 4°C hasta su visualización en un microscopio de fluorescencia Axioplan 2 (Zeiss).

### **3.5.3. Ensayos de proliferación celular**

Cultivos confluentes se tripsinizan y se siembran  $3 \times 10^4$  células / pocillo en placas de 24 pocillos. A cada tiempo, las células se tripsinizan y se cuentan. Las curvas de proliferación celular se obtienen representando el logaritmo del número de células obtenido tras la tripsinización frente al tiempo transcurrido desde la siembra.

La capacidad mitogénica de las células se determina sembrando las células en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 62.500 células/cm<sup>2</sup> en medio completo con suero fetal bovino (FBS) al 10% y tras 24 h se elimina el suero del medio. Un día más tarde, las células se incuban con 20 µg/ml de laminina, fibronectina, colágeno tipo I o IV, suero (2 – 20%) o PMA (0,1 – 1 µM) durante 4 h a 37 °C en presencia de 0,9 µCi de [<sup>3</sup>H]timidina por pocillo (35 Ci/mmol, 1 µCi/ml, Amersham). Transcurrido este tiempo, se retira el medio, se lavan las células con PBS, se incuban con ácido tricloroacético al 5% (v/v) en PBS y, después de 15 min a temperatura ambiente, se lavan 2 veces con etanol frío. A continuación, las células se solubilizan con 0,1% (p/v) SDS en NaOH 0,1 N. La radiactividad presente en cada muestra se determina en un contador de centelleo líquido LS3801 (Beckman).

### **3.6. CITOMETRÍA DE FLUJO**

Cultivos confluentes se tripsinizan y las células se dejan recuperar 30 min a 37°C en presencia de DMEM completo. Transcurrido este tiempo se lavan con PBS y se prepara una suspensión celular a la densidad adecuada tampón PBS/BSA. Alícuotas de  $25 \times 10^4$  células se incuban con 100 µl del anticuerpo primario, a la dilución correspondiente en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavan 3 veces con el tampón PBS/BSA, recogándose por centrifugación a 800g en una centrífuga refrigerada a 4°C (Medifriger, Selecta). Posteriormente se incuban con 100 µl del anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) en PBS, durante 45 min a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación. Después de tres lavados con tampón PBS/BSA, las células se conservan en 300 µl de PBS/BSA guardándose las muestras a 4°C hasta su valoración. Como valor control se toma la fluorescencia intrínseca de las células y la debida al segundo anticuerpo unido de manera inespecífica a las células en ausencia del primer anticuerpo.

Las medidas se realizan en un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson) del Centro de Citometría de Flujo y Confocal de la Universidad Complutense de Madrid, y los datos se procesan en un ordenador HP310.

### **3.7. INMUNOFLUORESCENCIA**

Se siembran  $25 \times 10^4$  células sobre cristales de 12 mm colocados en pocillos de placas de cultivo. Tras 3-4 días se retira el medio de cultivo, se lavan 3 veces con PBS para retirar células no adheridas, y las células fijadas se fijan con paraformaldehído al 2% en PBS durante 5 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se lavan 3 veces con PBS y se dejan secar. Los cubreobjetos fijados se lavan con PBS y se saturan durante 20 min a temperatura ambiente con BSA al 1% en PBS. Después se realizan 3 lavados con PBS y se incuba con el correspondiente anticuerpo primario durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. Seguidamente se lavan 5 veces con PBS y se incuba con el segundo anticuerpo que lleva unido el fluorocromo durante 45 min a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda y oscuridad. Después de 4 lavados en PBS, las preparaciones se dejan secar y se montan utilizando un conservante de la fluorescencia, guardándose a  $4^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. Los anticuerpos usados en citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, así como su procedencia y las diluciones empleadas se recogen en la Tabla IV.

La visualización de las muestras se hace utilizando un microscopio confocal Leica TCS SPE o un microscopio de fluorescencia Zeiss del Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la Universidad Complutense de Madrid.

### **3.8. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LÍQUIDO ASCÍTICO**

Para la producción de líquido ascítico se emplean ratones hembra BALB/c (Harlan Ibérica). Los ratones se tratan intraperitonealmente con 0,3-0,5 ml de pristano con el fin de causar irritación e inducir la aparición de granulomas para conseguir un ambiente óptimo para el crecimiento del hibridoma y obtener, de este modo, mayores niveles de anticuerpo. Una semana más tarde, las células del hibridoma 4F2 C-13 se resuspenden en PBS a la densidad celular adecuada y se inyectan  $5-10 \times 10^6$  células en la cavidad peritoneal usando una aguja de 1,1x40 mm (Becton Dickinson). Tras 7-8 días, el peritoneo de los ratones comienza a hincharse y se procede a la recolección de los ascites. Para ello, se inserta una aguja de 1,1x40 mm en el área inguinal del peritoneo de forma paralela a la columna, la cánula se coloca encima de un tubo recogiendo el fluido ascítico por gravedad.



Una vez recogido, el fluido se deja reposar un par de horas a temperatura ambiente por si se produce la formación de coágulos. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 1.500 rpm durante 10 min para eliminar los coágulos y la capa superior de grasa (color blanquecino). El sobrenadante se transvasa a un tubo nuevo y se congela a -20°C hasta su purificación.

Para la purificación de anticuerpo anti-4F2 C-13 del fluido ascítico se emplea una cromatografía de afinidad en proteína A-Sepharosa (Sigma). El gel se hidrata en agua y se empaqueta en una columna de cromatografía con una altura de 3 ml de lecho de gel, equilibrada con 20 ml de tampón fosfato 0,1M pH 8,0, 0,2% (p/v) azida sódica. Se comprueba el pH del eluido para asegurar el correcto equilibrado de la columna. Todo el proceso de purificación cromatográfico se realiza a 4°C.

El líquido ascítico se descongela y se centrifuga a 1.500 rpm durante 10 min, con el fin de eliminar coágulos que pudiesen aparecer tras el proceso de congelación, se diluye 1/2 con el tampón fosfato 0,1 M, pH 8,0, 0,2% (p/v) azida sódica y se filtra usando un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Renner). La muestra diluida y filtrada se carga en la columna, procurando que el flujo sea de alrededor de 6 ml/hora. El volumen no retenido se pasa al menos dos veces más por la columna para asegurar que la mayor cantidad posible del anticuerpo presente en el líquido ascítico queda retenida. A continuación la columna se lava con tampón fosfato 0,1 M, pH 8,0, 0,2% azida sódica recogiendo fracciones de 1 ml y midiendo su absorbancia a 280 nm. Cuando este valor es próximo a cero, el anticuerpo retenido se eluye empleando tampón citrato, pH 3,0, 0,2%(p/v) azida sódica. Se recogen fracciones de 1 ml en tubos en los que previamente se añade 250  $\mu\text{l}$  de tampón Tris 1 M, pH 9,0, para neutralizar el pH del eluido. Se mide la absorbancia a 280 nm de cada fracción eluida y, las fracciones que contienen el anticuerpo se juntan y se dializan frente a PBS. Una vez dializado se calcula la concentración de anticuerpo obtenido utilizando el coeficiente de extinción molar para la inmunoglobulina G ( $E^{0,1\%} \text{ IgG} = 1,35 \text{ cm} \cdot \text{ml} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), isotipo del anti-4F2 producido por el hibridoma. El dializado se alicuota y se congela a -20°C.

### **3.9. INMUNOPRECIPITACIÓN**

El lisado total (250  $\mu\text{g}$  de proteína) en tampón de lisis conteniendo Triton X-100 o CHAPS al 1% (v/v; p/v) e inhibidores de proteasas se preclarifica dos veces por incubación con 4B-Sepharosa (Sigma) durante 1 h a 4°C, con el fin de reducir la unión no específica de proteínas. Tras centrifugar, el sobrenadante se incuba con el

anticuerpo específico (~5 µg) durante toda la noche a 4°C en agitación. Se añaden 20 µl de proteína A-Sepharosa y se incuba durante 2 h a 4°C en agitación rotatoria. Transcurrido este tiempo, las partículas se lavan al menos 3 veces con tampón de lisis. El material retenido se eluye tras calentar durante 5 min a 95°C en 10 µl de tampón de aplicación de electroforesis 1x conteniendo β-mercaptoetanol al 5% (v/v). Después de centrifugar, los sobrenadantes se someten a PAGE-SDS y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa para realizar la inmunodetección.

### **3.10. GRADIENTES DE SACAROSA**

Células confluentes se recogen, se lisan en tampón MES 25, pH 7,0, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 1% (v/v) conteniendo inhibidores de proteasas y se pasan a través de una aguja de 25G al menos 5 veces a 4°C. Tras una centrifugación a 4.000 rpm durante 10 min, se añade al sobrenadante un volumen de sacarosa al 80% (p/v) en tampón MES alcanzándose una disolución de sacarosa al 40% (p/v) que se coloca en el fondo de un tubo de ultracentrífuga. Sobre esta disolución se añade cuidadosamente un gradiente de sacarosa discontinuo 30-5% (ambas disoluciones de sacarosa en tampón MES), creándose un gradiente continuo al centrifugar a 35.000 rpm, en un rotor flotante SW65 a 4°C durante 18 h. Se recogen fracciones de 400 µl con la ayuda de un capilar desde el fondo del tubo y se incuban durante 2 h a -20°C en presencia de un volumen de acetona/metanol (1:1) con el fin de precipitar las proteínas. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugan a velocidad máxima durante 10 min a 4°C. El precipitado de cada fracción se resuspende en 75-100 µl de tampón de aplicación 1x en presencia de β-mercaptoetanol al 5% (v/v) y se analiza mediante PAGE-SDS.

### **3.11. ENSAYO DE INVASIÓN *IN VITRO***

Las células se siembran a una densidad celular de 15.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pocillos y se dejan crecer hasta casi alcanzar la confluencia (85-90%). Se dibujan dos líneas paralelas en el fondo del pocillo con un rotulador y, a continuación, se hacen 3 brechas con una punta estéril de 200 µl sobre la monocapa perpendiculares a las líneas dibujadas previamente. Las células se lavan 2 veces con PBS para eliminar células flotantes, y se añade medio de cultivo completo. Las brechas se observan regularmente desde tiempo cero hasta que están completamente cerradas, aproximadamente unas 24 h después, utilizando un microscopio de contraste de fase Eclipse TE2000-U (objetivo 10X, Nikon). Se toman imágenes (n = 4) de ambas áreas que

flanquean las inserciones de las brechas y las líneas del rotulador a distintos tiempos y se mide el cierre de las brechas a partir de las imágenes digitalizadas empleando el programa Adobe Photoshop CS5.

### **3.12. ESTUDIOS DE TUMORIGENICIDAD *IN VIVO***

Las células se recogen por tripsinización, se centrifugan y se dejan recuperar durante al menos una hora a 37°C en medio de cultivo completo. Posteriormente, se lavan con PBS y se inyectan subcutáneamente  $6 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ l PBS, a ambos lados de la región lumbar, en ratones macho de 6-8 semanas de edad genéticamente atímicos (BALBc, Nu<sup>+</sup>/Nu<sup>-</sup>, Harlan). Los ratones se mantienen en un ambiente y en condiciones estériles en el animalario de la Universidad Complutense. La evolución de los posibles tumores se sigue diariamente para determinar cuando los tumores comienzan a ser visibles y, a partir de entonces, el tamaño del tumor se mide dos veces por semana. El período de latencia se estima como el número de días necesario para obtener tumores con 0,2-0,3 mm de diámetro. El tamaño del tumor se calcula midiendo con un calibre las dimensiones de la masa tumoral (la media de los dos diámetros perpendiculares del tumor) a varios tiempos tras la inyección. A los tiempos indicados, los ratones se sacrifican, los tumores se extraen en condiciones asépticas y se pesan. En cada uno de los ensayos se utilizan 3 ratones por grupo, y cada experimento se realiza, al menos, por duplicado.

### **3.13. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

#### **3.13.1. Valoración de la actividad de endoglicosidasas F y H**

La glicosilación es una modificación postraduccional frecuente en proteínas de eucariotas. En humanos, las glicosiltransferasas y glicosidasas se encuentran en la superficie luminal del retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. En su superficie se produce el procesamiento secuencial de glicoproteínas desde el retículo a través de la red del Golgi hacia el espacio extracelular. Se han descrito dos tipos de glicosilación mayoritarios: la N- y la O-glicosilación. La N-glicosilación tiene lugar en la membrana interna del retículo y consiste en la unión covalente de un oligosacárido a la cadena lateral de residuos de asparagina. En una etapa tardía del procesamiento proteico ocurre la O-glicosilación, concretamente en el aparato de Golgi. En este caso se produce la unión de la N-acetil-galactosamina a grupos hidroxilo de residuos de serina o

treonina, seguido de otros carbohidratos como la galactosa y el ácido siálico. Para el estudio de desglicosilación de 4F2hc se emplean la N-glicosidasa F o bien la endoglicosidasa H (New England BioLabs). La primera enzima tiene actividad de amidasa y es capaz de romper todos los tipos de N-glicosilación con el residuo de asparagina, desde la interacción con oligosacáridos ricos en manosa, pasando por híbridos, hasta los carbohidratos ramificados complejos. Por el contrario, la endoglicosidasa H es responsable sólo de la eliminación de carbohidratos ricos en manosa y algunos tipos híbridos de N-glicoproteínas.

Aproximadamente, 30 µg de proteína total en tampón de lisis en condiciones desnaturalizantes se calientan a 99°C durante 10 min. Después se añade 1µl de tampón de la enzima 10x y, en el caso de la N-glicosidasa F, la reacción se lleva acabo en presencia de Nonidet-P40 al 1% (v/v). A continuación se añaden 1,5 µl de la correspondiente enzima (37,5 U/µg de proteína), y se incuba a 37°C durante 1 h y 30 min. Transcurrido este tiempo, se añade tampón de carga 1x hasta un volumen final de 20 µl. Las digestiones se analizan mediante PAGE-SDS.

### **3.13.2. Valoración de la actividad de metaloproteinasas y cuantificación de la actividad de MMP-2**

La presencia de actividades degradativas de componentes de la matriz extracelular se analiza en los medios condicionados de los cultivos celulares. Para la obtención de los mismos las células se siembran en medio completo y cuando alcanzan 60-70% de confluencia, el medio se retira y se realizan dos lavados de 30 min de la monocapa celular con medio de cultivo libre de suero pero conteniendo glutamina y antibióticos a las concentraciones habituales. Después se mantiene el cultivo en medio libre de suero a 37°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, los medios condicionados se recogen y se centrifugan a 2.400 rpm durante 10 min para eliminar células que pudiesen encontrarse en suspensión. El sobrenadante se concentra por centrifugación empleando los filtros Vivaspin y Microcon (Millipore), con un poro promedio que excluye proteínas de masa molecular mayor de 10 kDa. Estos medios condicionados se utilizan para detectar la actividad de las MMP mediante zimogramas y su expresión mediante inmunotransferencia.

Las actividades de la MMP-2 y -9 (conocidas como gelatinasas) se determina mediante zimogramas de gelatina o gelatinogramas siguiendo el método descrito por Heussen y Dowdle (1980). Una vez conocida la concentración de cada muestra, se toma

el volumen correspondiente de los medios condicionados concentrados (5 µg) y se añaden 0,5 volúmenes de tampón de aplicación de muestras de electroforesis 3x en ausencia de agente reductor. A diferencia de lo anteriormente descrito para la PAGE-SDS, en el caso de los gelatinogramas las muestras no se desnaturalizan térmicamente y la electroforesis siempre se lleva a cabo en condiciones no reductoras para permitir la posterior renaturalización de las actividades gelatinolíticas. Se emplean geles de poliacrilamida al 10%, en presencia de SDS al 0,1% (p/v) que contienen 0,2% (v/v) de gelatina (Sigma). El desarrollo de la electroforesis se lleva a cabo a 4°C. Después los geles se lavan dos veces con tampón Tris 50 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 2,5% (v/v) a temperatura ambiente durante 30 min para eliminar el SDS presente en el gel. Seguidamente se realizan dos lavados con tampón Tris 50mM, pH 7,4, durante 10 min. A continuación, el gel se incuba en el tampón de incubación Tris 50 mM, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, Triton X-100 al 0,1% (v/v) y 0,02% (p/v) azida sódica durante 24-72 h a 37°C, favoreciéndose así la actividad gelatinasa.

Los geles se tiñen con una disolución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% (p/v) en metanol: acético: agua (5:1:5; v/v/v) durante 3 h a temperatura ambiente. El desteñido del gel se realiza por repetidos lavados en el líquido de desteñido [ácido acético al 7,5% (v/v) y metanol al 20% (v/v)]. La actividad gelatinolítica se detecta por la tinción negativa debido a la degradación de la gelatina presente en aquellas zonas del gel donde se localizan las metaloproteinasas.

La cuantificación de la actividad de la MMP-2 en los medios condicionados se lleva a cabo empleando un ensayo fluorimétrico. Se utiliza *SensoLyte 490 MMP-2 Assay kit* (AnaSpec), que se basa en la transferencia de fluorescencia mediante energía de resonancia (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), ya que contiene un péptido EDANS/DABCYL que es susceptible de sufrir rotura por la MMP-2. En el péptido intacto la fluorescencia debida al EDANS está apagada por la presencia cercana del DABCYL. Tras la escisión, éste se separa en dos fragmentos y el EDANS recupera su fluorescencia. La cuantificación de la actividad de MMP-2 se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en una placa de 96 pocillos se añaden 50 µl por pocillo del medio condicionado o bien de tampón de ensayo (control). La reacción enzimática comienza cuando se añaden 50 µl por pocillo del sustrato de MMP-2 diluido 1/100 en el tampón de ensayo proporcionado en el *kit* y, una vez añadido, se incuba 30 min a temperatura ambiente. La medida de la señal de fluorescencia se realiza a tiempo final, tras detener la reacción por adición de 50 µl por pocillo de la

disolución de parada en un fluorímetro Fluostar Optima (BMG LabTech) con longitudes de onda de excitación y de emisión de 490 y 520 nm, respectivamente. La fluorescencia obtenida, una vez restado el control, se expresa como unidades de fluorescencia relativa (RFU, *Relative Fluorescence Units*) referido a la concentración de proteína de cada muestra.

### **3.14. MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR: actividad de fosfatasa alcalina y expresión de dipeptidil peptidasa IV.**

Para la valoración de fosfatasa alcalina se sigue el protocolo propuesto por Schroy y col. (1994). Las células tripsinizadas se siembran en placas de cultivo (24 pocillos) a la densidad celular requerida y en medio DMEM completo. Transcurrido el tiempo adecuado, se retira el medio de cultivo, se lava la monocapa con PBS y se lisan las células en 200  $\mu$ l de tampón de lisis. La suspensión celular se pasa 10 veces a través de una aguja de 0,5 x 16 mm y se conserva a 4°C hasta su valoración. La actividad de fosfatasa alcalina se determina mediante un *kit* (Spinreact), utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato. Una concentración fija de sustrato (900  $\mu$ l de la solución comercial) se preincuba a 37°C durante 1 min en un espectrofotómetro termostatzado (DU 640, Beckman) antes de añadir 15  $\mu$ l de la muestra y medirse la absorción a 405 nm. El incremento de la absorbancia a 405 nm con el tiempo, debido a la formación de p-nitrofenol, es directamente proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada, tomándose la pendiente obtenida durante 2 min de incubación. Como blanco se considera la pendiente que generan 900  $\mu$ l de la solución comercial de sustrato en presencia de 15  $\mu$ l del tampón de lisis. La actividad de fosfatasa alcalina se mide en mU por miligramo de proteína total, siendo la unidad de actividad la cantidad de fosfatasa alcalina necesaria para producir 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto a 37°C.

La expresión de la dipeptidil peptidasa IV (CD26) se analiza mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito anteriormente, empleando el anticuerpo anti-CD26 marcado con ficoeritrina (BD Biosciences, 20  $\mu$ l por  $10^6$  células).

### **3.15. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN Y DE LUCIFERASA**

Las células se siembran en placas de 24 pocillos y se cultivan hasta que se encuentran en fase exponencial. En este punto las monocapas se lavan dos veces con

medio de cultivo en ausencia de suero y se incuban con 1 µg de DNA durante 16 h a 37°C en presencia del reactivo de transfección Escort IV (Sigma).

A continuación se cambia el medio de cultivo, adicionando medio completo y se dejan recuperar durante 24 h a 37°C. Después de tratar las células con el agente indicado en las condiciones adecuadas, éstas se recogen en tampón de lisis suministrado en el *kit Luciferase Reporter Gene Assay* (Roche), se incuban a temperatura ambiente durante 15 min y se centrifugan durante 5 min a 5.000 rpm y 4°C. Finalmente, se mezclan 50 µl del sobrenadante con 100 µl de sustrato de la luciferasa por agitación en vórtex y se mide la actividad en un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold, Germany).

En estos ensayos se ha empleado el plásmido pWWP-Luc cedido por el Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, MD) que contiene el promotor de p21 ligado al gen de la luciferasa.

### **3.16. ARRAYS**

#### ***Array de tejidos***

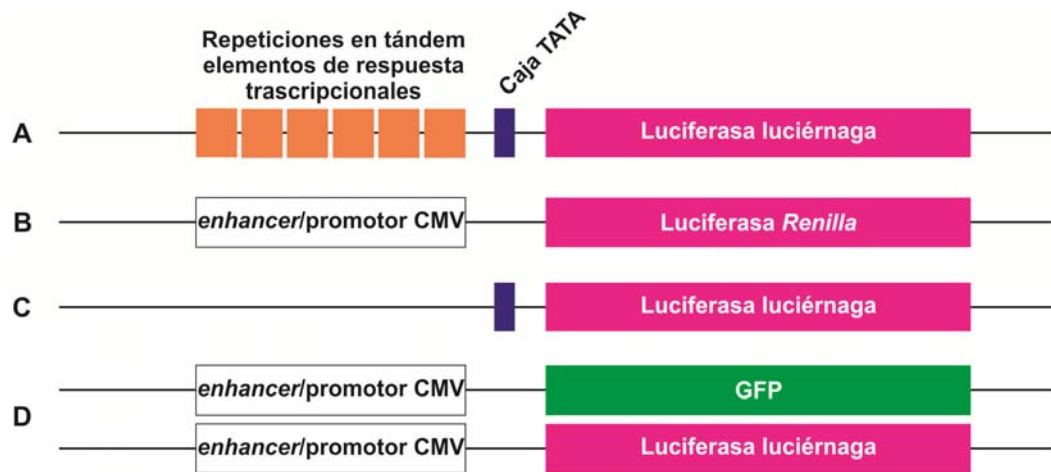
Se emplea un sistema que contiene tejidos normales y tumorales para determinar la expresión de 4F2hc (*Frozen Tumor Tissue Array*, BioChain Institute, Inc.). Éste contiene 30 secciones de tejidos, de diferentes orígenes tisulares, de 2 mm de diámetro y 5-8 µm de grosor. Estas secciones están montadas en parejas (normal/tumoral) sobre un portaobjetos con carga positiva, y fijadas con acetona fría. Este panel de tejidos se utiliza para inmunohistoquímica siguiendo el protocolo descrito para inmunofluorescencia empleando el anticuerpo CD98 FG 1/8 (amablemente cedido por el Dr. Sánchez Madrid).

#### ***Array de rutas de señalización***

Para localizar las vías de señalización afectadas bien por el silenciamiento de 4F2hc o bien por el tratamiento con inhibidores de histona desacetilasas se llevan a cabo *arrays* de rutas de señalización (*Signal Finder Reporter Array*, SABiosciences). Cada *array* se realiza en una placa de 96 pocillos y consiste en 10 ensayos de luciferasa dual (además de los correspondientes controles positivo y negativo). Cada una de las 12 columnas de la placa de 96 pocillos contiene el *reporter* específico para una ruta de señalización o el correspondiente control. En cada pocillo se encuentra una mezcla de una construcción que contiene el elemento de respuesta inducible por un determinado

factor de transcripción (repeticiones en tándem del elemento de respuesta transcripcional específico de la ruta seguido del gen de la luciferasa de luciérnaga) y una construcción que asegura la expresión constitutiva de la luciferasa de *Renilla* (el gen se encuentra bajo el control del intensificador/promotor temprano del CMV) como control interno de la transfección (Figura 8).

Los ensayos se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante, usando Escort IV (Sigma) como reactivo para llevar a cabo la transfección reversa de las células, OptiMEM (Invitrogen, Life Technologies) como medio de cultivo y *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega) para detectar la actividad luciferasa en un luminómetro Fluostar Optima (BMG LabTech).



**Figura 8. Representación esquemática de las construcciones implicadas en el array de las rutas de señalización.** A) Construcción que contiene el elemento de respuesta inducible por un determinado factor de transcripción y que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga. B) Construcción que expresa de forma constitutiva la luciferasa de *Renilla*. C) Control negativo, no inducible. D) Control positivo, en el que se encuentran las dos construcciones que codifican para la expresión constitutiva de GFP o de la luciferasa de luciérnaga.





## 4. Resultados



## 4.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE 4F2hc

4F2hc es una proteína multifuncional con un gran dominio C-terminal extracelular cuya estructura recuerda a las  $\alpha$ -amilasas. Esta proteína, con un único segmento transmembrana, se une covalentemente a una cadena ligera formando un heterodímero en la superficie celular que está implicado en el transporte de aminoácidos. Asimismo, 4F2hc interacciona con la cadena  $\beta 1$  de integrinas modulando procesos dependientes de la activación de la señalización integrina como adhesión, migración e incluso transformación.

### 4.1.1. Estructura del ectodominio de 4F2hc

El dominio C-terminal de 4F2hc tiene una estructura similar a la de las  $\alpha$ -amilasas pero carece de los residuos catalíticos y, por tanto, de actividad enzimática, aunque podría retener su capacidad de unión a glicanos. Sólo dos de los 3 dominios de las  $\alpha$ -amilasas están presentes en 4F2hc-ED: el dominio A, una estructura de barril TIM, conectado por 6 residuos en  $\alpha$ -hélice al dominio C, compuesto principalmente por láminas  $\beta$ -antiparalelas formando un sándwich  $\beta$ . *In vivo*, 4F2hc forma homodímeros estabilizados por un puente disulfuro a través del residuo Cys<sup>109</sup>. Este residuo no se encuentra en el ectodominio recombinante, ya que éste comienza en el residuo Glu<sup>111</sup> y termina en el Ala<sup>529</sup>. Sin embargo, el cristal ortorrómbico obtenido para 4F2hc-ED (PDB 2DH3) está constituido por homodímeros debido al contacto entre las superficies polares de los dominios C de ambas subunidades, y está estabilizado por el establecimiento de 10 puentes de hidrógeno y un puente salino. Además, en un principio se pensó que la coordinación con un átomo de Zn<sup>2+</sup> (coordinado entre ambas subunidades a través de los residuos Asp<sup>439</sup>, His<sup>441</sup> e His<sup>455</sup> del monómero 1 y la His<sup>441</sup> del monómero 2) era necesaria para la coordinación (Fort y col., 2007).

Para obtener información sobre su potencial dimerización-oligomerización en disolución así como de su mecanismo de plegamiento. Se ha llevado a cabo la caracterización espectroscópica/estructural del 4F2hc-ED recombinante.

Los resultados de dichos estudios se exponen a continuación de forma breve, ya que están recogidos en la siguiente una publicación:

Javier Turnay, Joana Fort, Nieves Olmo, Angélica Santiago-Gómez, Manuel Palacín, M<sup>a</sup> Antonia Lizarbe. «*Structural characterization and unfolding mechanism of human 4F2hc ectodomain*». *Biochimica et Biophysica Acta*, **1814**: 536-544 (2011)

Inicialmente se analizó la potencial oligomerización del 4F2hc-ED en ausencia y presencia de cationes divalentes mediante entrecruzamiento químico. Para dichos experimentos se han empleado BS<sup>3</sup> (bis[sulfocuccinimidil]suberato) o glutaraldehído purificado a concentraciones de proteína en el rango 0,2–1 mg/ml (4,4–21,3  $\mu$ M). Además, se ha analizado si la presencia de cationes divalentes como el Zn<sup>2+</sup> o el Ca<sup>2+</sup> influía sobre la capacidad de dimerización. Los resultados han mostrado que, ni en ausencia ni en presencia de Ca<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup> a concentraciones de 10 y 100  $\mu$ M se observan dímeros u oligómeros de 4F2hc-ED. Se probaron también concentraciones superiores de ambos cationes obteniéndose resultados similares. Los estudios de equilibrio de sedimentación por ultracentrifugación analítica rindieron los mismos resultados. En conjunto, los resultados indican que el ectodominio recombinante permanece en su forma monomérica en disolución independientemente de la existencia de cationes divalentes en el medio. Asimismo mediante dicroísmo circular en el UV-lejano se ha determinado la estructura secundaria del ectodominio recombinante, obteniéndose un 30% de  $\alpha$ -hélice y un 20% de  $\beta$ -lámina (12% antiparalela y 8% paralela), lo que se asemeja a la estructura determinada por cristalografía de rayos X. Estudios de desnaturalización térmica, tanto por dicroísmo circular como por calorimetría diferencial de barrido, indican que la estructura de la proteína es compacta y térmicamente muy estable con una temperatura de transición entre los 57–59 °C. Además, la desnaturalización térmica provoca la exposición de regiones hidrofóbicas promoviendo su asociación formando complejos desordenados que guardan cierta similitud con estructuras  $\beta$ , lo que causa la irreversibilidad del proceso. El análisis del ambiente de los residuos de Trp de 4F2hc-ED indica que los 9 Trp están mayoritariamente enterrados e inmovilizados en el núcleo hidrofóbico de la proteína como sugieren los espectros de dicroísmo circular en el UV-próximo, el máximo de emisión de fluorescencia de Trp (323 nm) y la constante de apagamiento por acrilamida (2,6 M<sup>-1</sup>). Con el fin de entender el mecanismo de plegamiento/desnaturalización de 4F2hc-ED se han analizado los cambios en la estructura secundaria así como en la terciaria tras la exposición a concentraciones crecientes de urea. Los análisis por dicroísmo circular en el UV-lejano así como los espectros de emisión de fluorescencia sugieren que la desnaturalización se ajusta a un modelo de 4 estados con dos especies intermedias (I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>), que parecen ser aparentemente estables a una actividad de urea de alrededor de 3 y 4,5 M, respectivamente. Sin embargo, en el paso de la estructura

nativa a  $I_1$ , si bien se observa un cambio significativo en el ambiente de los residuos de Trp, sólo una pequeña variación se detecta en la estructura secundaria. Este cambio afecta principalmente a una reducción del contenido en  $\alpha$ -hélice; por lo tanto, el primer paso en el desplegamiento no implica una reorganización de la estructura nativa. Este intermedio  $I_1$  representaría una estructura de glóbulo fundido (*molten globule*) que mantiene la estructura secundaria global. En cambio, en  $I_2$ , casi todos los residuos de Trp están expuestos y se ha perdido el 90% de la estructura secundaria, principalmente  $\alpha$ -hélices. En este estado ocurre una gran reorganización de la estructura secundaria permitiendo el acceso de moléculas de agua y urea, dando lugar a la formación de estructuras tipo  $\beta$  plegadas de forma incorrecta. Por lo tanto, 4F2hc-ED recombinante es una proteína con alta estabilidad térmica que se encuentra en forma de monómero en solución. El desplegamiento de los dos dominios de la proteína no ocurre de forma secuencial, sino que tiene lugar mediante un mecanismo en el que están implicados dos estados intermedios: una estructura tipo glóbulo fundido ( $I_1$ ) y un estado casi desplegado ( $I_2$ ) formado por hebras  $\beta$  residuales estabilizadas por interacciones hidrofóbicas.

### Aportación personal

En este trabajo se ha participado en los experimentos de entrecruzamiento con BS<sup>3</sup> o glutaraldehído en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, en la determinación de la concentración de proteína y del coeficiente de extinción molar y en los estudios de apagamiento de la fluorescencia por acrilamida.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbapap](http://www.elsevier.com/locate/bbapap)



## Structural characterization and unfolding mechanism of human 4F2hc ectodomain

Javier Turnay<sup>a</sup>, Joana Fort<sup>b</sup>, Nieves Olmo<sup>a</sup>, Angélica Santiago-Gómez<sup>a</sup>,  
Manuel Palacín<sup>b</sup>, M<sup>a</sup> Antonia Lizarbe<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Biomédica, Parque Científico de Barcelona, 08028-Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 November 2010  
Received in revised form 17 January 2011  
Accepted 17 February 2011  
Available online 23 February 2011

#### Keywords:

CD98hc  
Circular dichroism  
Fluorescence spectroscopy  
Molten globule  
TIM barrel  
Urea denaturation.

### ABSTRACT

4F2hc (CD98hc) is a multifunctional type II membrane glycoprotein involved in several functions as amino acid transport, cell fusion,  $\beta$ 1-integrin-signaling and transformation. 4F2hc ectodomain has been crystallized and its three-dimensional structure determined. We have carried out a spectroscopical/structural characterization of the recombinant ectodomain in order to obtain information on its dynamic structure in solution and on its ability to form homodimers by itself in the absence of the transmembrane helix and of the potential interactions with the plasma membrane. Analytical ultracentrifugation and crosslinking experiments showed that the ectodomain is monomeric in solution. The secondary structure determined by far-UV circular dichroism (CD) spectroscopy (around 30%  $\alpha$ -helix and 20%  $\beta$ -sheets, 12% antiparallel helix and 8% parallel) reveals a compact and thermally stable structure with a high melting temperature (57–59 °C). Tryptophan residues are mainly buried and immobilized in the hydrophobic core of the protein as suggested by near-UV CD spectrum, the position of the Trp maximum fluorescence emission (323 nm) and from the acrylamide quenching constant ( $2.6 \text{ M}^{-1}$ ). Urea unfolding equilibrium has been studied by far-UV CD and fluorescence spectroscopy to gain information on the folding/unfolding process of the ectodomain. The analyses suggest the existence of two intermediate states as reported for other TIM barrel-containing proteins rather than an independent unfolding of each domain [A, ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> barrel; C, antiparallel  $\beta$ <sub>8</sub> sandwich]. Folding seems to be directed by the initial formation of hydrophobic clusters within the first strands of the  $\beta$ -barrel of domain A followed by additional hydrophobic interactions in domain C.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

4F2hc is a multifunctional type II membrane glycoprotein, also known as CD98hc, FRP-1 or SLC3A2, which is involved in amino acid transport [1]; together with the homologous rBAT constitute the heavy chains of the heteromeric amino acid transporters or HATs [2]. It has been described that 4F2hc controls the cell surface expression of the light chains of HATs as well as the membrane topology of the 4F2 heterodimers [3]. The physiological relevance of 4F2hc-associated transporters is highlighted by the fact that mutations in the light subunit y<sup>+</sup>LAT1 cause the aminoaciduria lysinuric protein intolerance [2], and the transporter x<sub>c</sub><sup>-</sup> (xCT/4F2hc) is involved in cell redox balance [4], Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection [5] and cocaine relapse [6]. Nicklin et al. [7] have reported the involvement of the bidirectional amino acid transporter LAT1/4F2hc in the upstream regulation of mTOR via efflux of L-Gln out of the cells and uptake of L-Leu and other essential amino acids. mTOR activation leads to increased protein translation and inhibition of autophagy, thus promoting cell growth and proliferation. This finding is of special relevance as it

contributes to explain the involvement of 4F2hc in tumorigenesis. In addition, several other functions have been ascribed to this protein, as its involvement in cell fusion [8],  $\beta$ 1-integrin-signaling [9], embryonic implantation [10], cell transformation [11] and tumorigenesis [12].

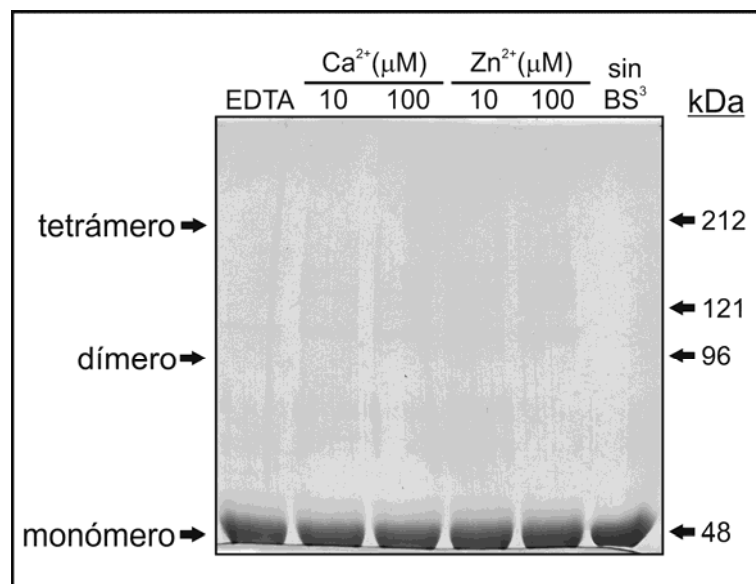
The crystal structure of the ectodomain (4F2hc-ED) has been solved using monoclinic (PDB ID: 2DH2) and orthorhombic (PDB ID: 2DH3) crystal forms at 2.1 and 2.8 Å, respectively [13]. The overall structure is similar to that of bacterial  $\alpha$ -amylases but lacking essential residues from the catalytic site and thus, enzymatic activity. Two of the three domains of  $\alpha$ -amylases are present in 4F2hc ectodomain, the so-called N-terminal domain A, a highly stable structure of TIM barrel, with 8 internal parallel  $\beta$ -sheets surrounded by 8 long  $\alpha$ -helices [( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>, connected by a 6-residue  $\alpha$ -helix to the C-terminal domain (C-domain in  $\alpha$ -amylases) composed mainly by antiparallel  $\beta$ -sheets forming a  $\beta$ -sandwich. These two domains are held together mainly by hydrophobic interactions between secondary structure elements A $\alpha$ 6 to A $\alpha$ 8 and C $\beta$ 1 to C $\beta$ 3 [13]. Taking into account the similarities with  $\alpha$ -amylases [14], it has been proposed that 4F2hc and other HAT heavy chains may still retain glycosidase-like binding properties, but to date no glycan has been shown to interact with the wide cleft of 4F2hc-ED. In any case, this region may still be able to bind other ligands such as proteins or glycoproteins as some glycosidase inhibitors with Ig-like structure bind at the catalytic cleft of glycosidases, as Tendamistat [15]. Following on

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4256; fax: +34 91 394 4159.  
E-mail address: [lizarbe@bbm1.ucm.es](mailto:lizarbe@bbm1.ucm.es) (M.A. Lizarbe).

## RESULTADOS ADICIONALES

En la Figura 9 se muestra un ensayo representativo de entrecruzamiento de 4F2hc-ED a una concentración de 1 mg/ml llevado a cabo con BS<sup>3</sup> en ausencia (EDTA 2mM) o presencia de Ca<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup> a las concentraciones indicadas. Como se puede observar en todas las condiciones analizadas, sólo se detecta la forma monomérica de la proteína recombinante.

En estudios posteriores realizados por el grupo de investigación se utilizan liposomas unilamelares formados por fosfatidilcolina o fosfatidilserina, para determinar el potencial entrecruzamiento de la proteína, utilizando condiciones de proteína similares a los experimentos anteriores. Los resultados indican que 4F2hc-ED es capaz de dimerizar en presencia de bicapas lipídicas de fosfatidilcolina, incluso se detecta la formación de tetrámeros cuando se incrementa la relación molar lípido:proteína. Sin embargo, la dimerización no es evidente en el caso de fosfatidilserina. Por lo tanto, ahora se podría proponer que 4F2hc-ED homodimeriza en presencia de bicapas lipídicas, coincidiendo con el comportamiento del ectodominio tras su transfección en células HeLa (Fort y col., 2007).



**Figura 9. Entrecruzamiento de 4F2hc-ED en presencia y ausencia de cationes divalentes.** Se indica la movilidad de los patrones de masa molecular y las posiciones que deberían ocupar los posibles dímeros y tetrámeros del ectodominio. Se realiza una PAGE-SDS empleando geles al 7%, las muestras se desnaturalizan en condiciones reductoras y la tinción se lleva a cabo mediante azul de Coomassie.



### 4.1.2. 4F2hc y tumorigénesis en células HeLa

4F2hc se ha considerado un potencial oncogén, en el que su interacción con las integrinas  $\beta 1$  modulan la señalización dependiente de integrina, proceso clave durante el proceso de transformación. De hecho, se han observado anormalidades de la función de las integrinas en muchos tipos de cáncer. Además, la sobreexpresión de 4F2hc conduce a la transformación de células normales, mientras que su delección en células madre embrionarias impide la formación de teratocarcinomas, habilidad que se recupera cuando se reexpresa una proteína quimérica capaz de interaccionar con las integrinas  $\beta 1$ . Por otro lado, 4F2hc forma un complejo multimolecular de membrana en el que se asocia con otras proteínas como CD147/EMMPRIN, cuya expresión se ha correlacionado con invasividad y metástasis.

Por todo ello se ha llevado a cabo el estudio sobre la implicación de 4F2hc en el proceso tumoral. Las células HeLa se han utilizado en diversos estudios relacionados con 4F2hc y realizados por el grupo de investigación (Fort y col., 2007). Por ejemplo en la cotransfección con dos versiones marcadas del 4F2hc humano (4F2hc-HA, marcado con hemaglutinina en el C-terminal y His-4F2hc, marcado con seis His en el N-terminal) para demostrar la formación de homodímeros sólo en las células cotransfectadas. Además, se ha conseguido la represión de la expresión de 4F2hc de forma satisfactoria. Con este sistema modelo se ha procedido a analizar el papel de 4F2hc en tumorigénesis. Los principales resultados obtenidos están recopilados en el manuscrito que se encuentra en fase de corrección:

Angélica Santiago-Gómez, Juan Ignacio Barrasa, Nives Olmo, Hans Burghardt, Manuel Palacín, Javier Turnay, M<sup>a</sup> Antonia Lizarbe. «4F2hc-silencing impairs tumorigenicity of HeLa cells via modulation of  $\beta$ -integrin signaling and MMP-2 expression and secretion». Enviado a publicar.

En este trabajo se ha silenciado de forma estable la expresión de 4F2hc en células HeLa mediante un miRNA artificial (denominado 947), que se expresa de forma constitutiva debido a su integración en el genoma de la célula por medio de un sistema de vectores lentivirales derivados del HIV. De esta forma se obtuvieron dos líneas celulares: las HeLa-scr, utilizado como control, que muestran un nivel de expresión de la proteína similar a las células sin transducir, y las células HeLa-947, en las que la expresión de 4F2hc se ha reducido aproximadamente un 80%. Los estudios de tumorigenicidad *in vivo* indicaron que la velocidad de crecimiento del tumor es similar

en ambas líneas celulares, si bien el silenciamiento de 4F2hc produce una ralentización del crecimiento alargando la fase de latencia. El desarrollo del tumor en las células HeLa-947 ocurre 4 días más tarde que las HeLa-scr, lo que se traduce en una reducción del 39% en el peso del tumor tras 24 días. Además, las células de los tumores presentan un grado de silenciamiento de 4F2hc muy inferior al de las células inyectadas, 20 o 30% de silenciamiento en la parte interna o externa del tumor, respectivamente. Ello apunta a que 4F2hc parece ser crucial para la supervivencia y proliferación de las células en las etapas iniciales de la tumorigénesis.

Para la supervivencia de las células adherentes y procesos que preceden a la proliferación son la adhesión y la extensión celular. Estas interacciones célula-ECM están mediadas por integrinas que integran las señales procedentes del exterior e interior celular induciendo vías de señalización que regulan supervivencia y proliferación. Se ha descrito que 4F2hc es capaz de modular la señalización por integrinas, por lo que se analizaron estos procesos dependientes de integrina *in vitro*. El silenciamiento de 4F2hc no afecta a la adhesión, extensión ni proliferación de las células en presencia de componentes de la ECM. En cambio, se observó una menor proliferación de las células silenciadas en respuesta a mitógenos como el suero y el éster de forbol PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*). Asimismo, se ha detectado que 4F2hc colocaliza en la membrana celular con las integrinas  $\beta 1$  y con CD147/EMMPRIN, así como la colocalización entre estas dos últimas. Ello sugiere la formación de un complejo multimolecular en la superficie de las células HeLa al igual que se ha descrito en otros tipos celulares (Xu y Hemler, 2005).

Se ha analizado si la represión de 4F2hc produce alguna modificación en la expresión de otras proteínas relacionadas. Al silenciar la cadena pesada no se alteran de forma significativa los niveles de expresión de galectina-3, su ligando fisiológico, integrinas  $\beta 1$  y CD147/EMMPRIN. Sin embargo, el silenciamiento de 4F2hc promueve una disminución de los niveles totales de la MMP-2, proteína inducida por CD147/EMMPRIN. Las MMP están implicadas en invasión tumoral y metástasis degradando la ECM; concretamente la MMP-2 degrada el mayor componente de la lámina basal, el colágeno tipo IV. Por ello, se ha valorado su expresión y actividad en medios condicionados, demostrándose que el silenciamiento de 4F2hc reduce de forma muy significativa la expresión de MMP-2 así como su actividad (~70%) en el espacio extracelular. Ello conduce a una acumulación extracelular de proteínas susceptibles de sufrir proteólisis por esta MMP, como galectina-3. Como la MMP-2 está implicada en el

avance del tumor, se ha estudiado si la migración celular se afecta al silenciar 4F2hc. Estos estudios indicaron que la motilidad celular se encuentra significativamente reducida en las células en las que se ha silenciado 4F2hc. Es la primera vez que se describe que la expresión de 4F2hc en células tumorales facilita la motilidad celular posiblemente relacionado con la modulación de la expresión de la MMP-2.

El silenciamiento de 4F2hc interfiere en la señalización dependiente de integrinas, detectándose una reducción de la activación de FAK y Akt. De hecho, también disminuye la fosforilación de GSK-3 $\beta$  en la Ser<sup>9</sup>, una diana secundaria de Akt capaz de promover la degradación de moléculas implicadas en la transición epitelio-mesénquima como  $\beta$ -catenina y Snail. La reducción de la fosforilación de GSK-3 $\beta$  en este residuo inhibitorio causa la activación de la quinasa, observándose una disminución de los niveles totales de  $\beta$ -catenina. Esta situación no es consecuencia de su acumulación en el núcleo, sino de un incremento en su degradación proteasomal dirigida por la fosforilación de GSK-3 $\beta$ . También se ha observado una disminución de la activación de ERK1/2 dependiente de integrina en las células silenciadas que, además, podría ser la causa de la disminución de la expresión de la MMP-2, ya que CD147/EMMPRIN induce la expresión de las MMP a través de la señalización dependiente de las MAPK. Adicionalmente se ha comprobado que la represión de 4F2hc afecta a otras vías de transducción de la señal que están directamente implicadas en la progresión tumoral, como la señalización inducida por hipoxia dependiente de HIF-1, que controla la expresión de factores angiogénicos e invasivos promoviendo la diseminación tumoral.

En resumen, la expresión de 4F2hc facilita la invasión tumoral promoviendo la motilidad celular a través de la MMP-2 en células HeLa. El silenciamiento de 4F2hc afecta a la proliferación *in vivo* e *in vitro* disminuyendo la activación de las vías de señalización dependientes de integrina como FAK, Akt y ERK1/2. Además esta represión de la expresión conduce a un aumento de la degradación de  $\beta$ -catenina y una disminución de la señalización de hipoxia, lo que podría ser responsable de la reversión de la transición epitelio-mesénquima y por lo tanto de la progresión tumoral.

### Aportación personal

En este trabajo se ha participado en la realización de los estudios de la valoración de la expresión de 4F2hc y otras proteínas en las células HeLa transducidas, en los estudios de tumorigenicidad *in vivo* así como en la caracterización funcional *in*

*vitro* (adhesión, extensión, proliferación). También se ha colaborado en la obtención y valoración de medios condicionados para la cuantificación de la actividad de MMP-2, en los ensayos de motilidad celular y en los efectos del silenciamiento de 4F2hc sobre las rutas de señalización.

## 4F2hc-silencing impairs tumorigenicity of HeLa cells via modulation of $\beta$ -integrin signaling and MMP-2 expression and secretion

Angélica Santiago-Gómez<sup>1</sup>, Juan I. Barrasa<sup>1</sup>, Nieves Olmo<sup>1</sup>, Hans Burghardt<sup>2</sup>, Manuel Palacín<sup>2</sup>, Javier Turnay<sup>1</sup> and M<sup>a</sup> Antonia Lizarbe<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Biomédica, Parque Científico de Barcelona, 08028- Barcelona, Spain

**Keywords:** 4F2hc,  $\beta$ -catenin, CD98hc, galectin-3, HeLa cells, integrin signaling, matrix metalloproteinases

**\*To whom correspondence should be addressed:** Prof. M.A. Lizarbe, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain. E-mail: lizarbe@bbm1.ucm.es. Telephone: +34-91 394 4256. Fax: +34 91 394 4159

### Abstract

4F2hc is a type-II glycoprotein whose covalent-bound association with one of several light chains described forms a heterodimer mainly involved in large neutral amino acid transporter. Likewise, the heavy chain interacts with  $\beta$ -integrins mediating integrin-dependent events such as survival, proliferation, migration and even transformation. It is a ubiquitous protein whose overexpression is related to tumor development and progression. Stable silencing of 4F2hc in HeLa cells, using an artificial miRNA constitutively expressed by means of a HIV-derived lentiviral system, shows impaired *in vivo* tumorigenicity and an ineffective proliferation response to mitogens. 4F2hc colocalizes with  $\beta$ 1-integrins and CD147/EMMPRIN, but this interaction does not occur in lipid rafts in HeLa cells. Moreover, silenced cells present defects in integrin- (FAK, Akt and ERK1/2) and hypoxia-dependent signaling, reduced expression/activity of MMP-2 and increased degradation of  $\beta$ -catenin. Furthermore, cell motility is compromised after protein silencing, being this the first time that 4F2hc is related to tumor invasion by facilitating cell motility. Therefore, 4F2hc participates in tumor progression, favoring first steps of epithelial-mesenchymal transition, by inhibiting  $\beta$ -catenin proteasomal degradation through Akt/GSK-3 $\beta$  signaling and enabling cell motility and neovascularization.

### Introduction

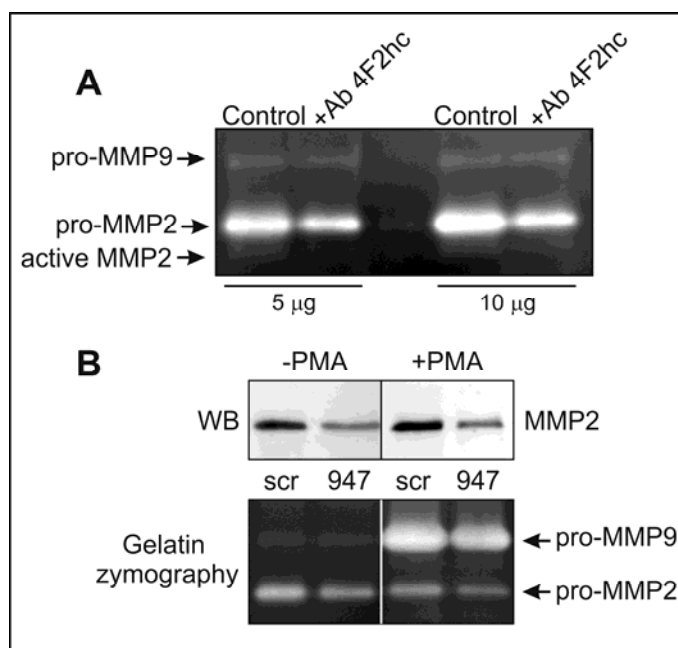
4F2hc (also known as CD98hc or SLC3A2) was first described as part of a cell-surface antigen which led to T-lymphocyte activation (Haynes, 1981); since then, several additional cell functions have been described. This type-II glycoprotein is covalently bound to one of several described light chains, allowing them to reach the membrane and

then enabling heteromeric amino acid transport which regulates mTOR pathway (Chillarón et al., 2001; Nicklin et al., 2009). 4F2hc also associates with  $\beta$ 1-integrins mediating integrin-dependent events such as survival, proliferation, migration and even transformation (Fenczik et al., 1997; Feral et al., 2005). Its deletion in embryonic stem cells impairs integrin-dependent signaling pathways such as FAK, Rac and Akt, increases anchorage-independent induced apoptosis (anoikis) and markedly reduces *in vivo* teratocarcinoma formation (Feral et al., 2005). Furthermore, 4F2hc is highly expressed in tumors of different origin as well as in established tumor cell lines, and it has been suggested that its overexpression mediates malignant transformation via its interaction with  $\beta$ 1-integrins (Hara et al., 1999). Moreover, 4F2hc could even be implicated in the acquisition of a multidrug resistant phenotype (Yang et al., 2007). Therefore, 4F2hc has been proposed as a potential tumor marker as its overexpression is an indicator of poor prognosis in patients who have suffered breast, lung and several other types of cancer, and is currently under study as a prospective therapeutic target (Esseghir et al., 2006; Furuya et al., 2012; Kaira et al., 2011a; Kaira et al., 2010).

On the other hand, 4F2hc has been reported to be part of a multicomponent complex on cell membrane which includes CD147, EpCAM and another amino acid transporter (ASCT2) (Xu and Hemler, 2005). CD147 acts as a chaperone for monocarboxylate transporters (MCT-1 and MCT-4) and leads them towards the cell membrane where they carry out transport of lactate and pyruvate (Kirk et al., 2000); it also interacts with  $\beta$ 1-integrin and caveolin-1 (Berdichevski et al., 1997; Tang and Hemler, 2004). The interaction between 4F2hc and CD147 (highly glycosylated form) regulates energetic metabolism through AMP-activated

## RESULTADOS ADICIONALES

Para confirmar el papel de 4F2hc en la regulación de la MMP-2 se ha valorado la actividad de las MMP tras el tratamiento con el anticuerpo anti-4F2 C-13, anticuerpo que estimula la adhesión celular a componentes de la ECM (Fenczik y col., 1997). El entrecruzamiento de 4F2hc en las células HeLa induce una disminución de la actividad de la MMP-2, no viéndose afectada la MMP-9 (Figura 10A).

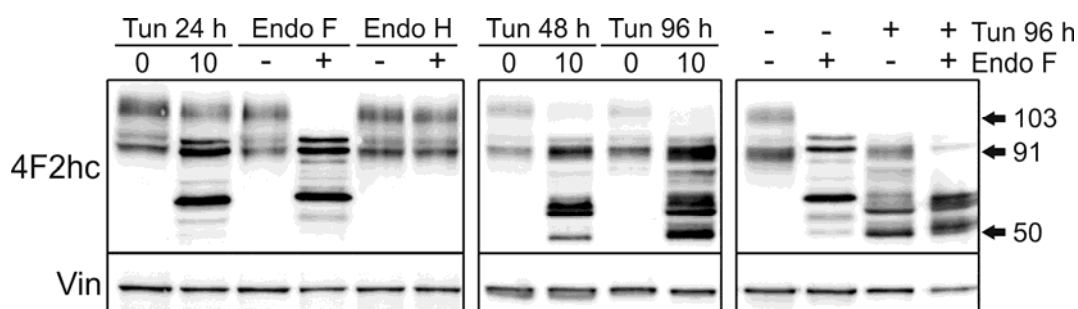


**Figura 10. Efecto del entrecruzamiento de 4F2hc y del PMA sobre la actividad de las MMP-2 y MMP-9.** Actividad de las gelatinasas en: (A) medios condicionados de células HeLa en ausencia o presencia del anticuerpo anti-4F2hc C-13 (50 µg/ml) y sin suero durante 24 h; (B) medios condicionados de células HeLa-scr y HeLa-947 tratadas con y sin PMA (0,1 µM) durante 6 h. Los medios condicionados se recogen y procesan como se indica en materiales y métodos.

Habiéndose observado que el silenciamiento de 4F2hc disminuye la expresión/actividad de la MMP-2 y la activación de ERK1/2, se han tratado las células con PMA. Este éster de forbol que promueve la fosforilación de ERK1/2 a través de la activación directa de PKC (Verin y col., 2000) y permite comprobar si la señalización ERK1/2 modula la expresión de la MMP-2 en las células HeLa. Tras 6 h de incubación con PMA, los medios condicionados se recogen y se determina la expresión y actividad de las MMP (Figura 10B). El tratamiento con PMA no induce la expresión de la MMP-2 en las células HeLa ni en las HeLa-947. Por el contrario, y como se había descrito en la literatura para las células HeLa (Roomi y col., 2010), la incubación con PMA conduce a

inducción significativa de la expresión de la MMP-9 tanto en las células control como en las silenciadas. Ello apunta en este caso, a que la inducción de la expresión de la MMP-2 en las células HeLa no viene determinada por el estado de activación de ERK1/2.

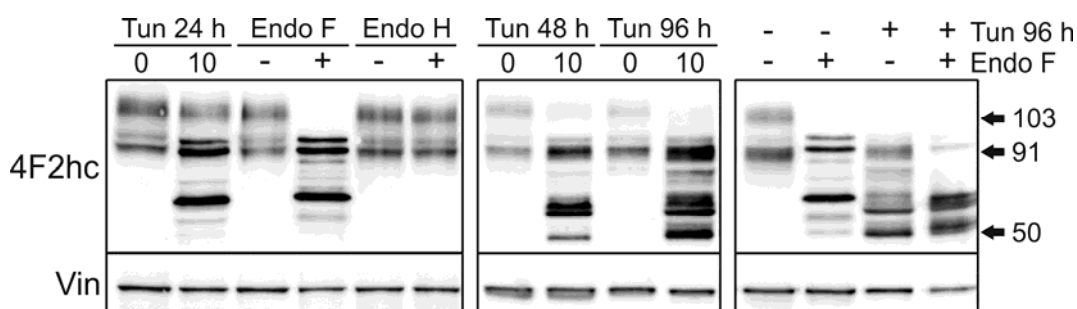
Estudios realizados por el grupo del Dr. Palacín sobre el gen *SLC3A2* que codifica 4F2hc, reveló la existencia de otros potenciales lugares de iniciación de la transcripción o de variantes de *splicing* alternativo, que podrían dar cuenta de distintas isoformas de la proteína, pudiendo incluso estar relacionadas con el desarrollo tumoral. Con el fin de confirmar la existencia de alguna de estas isoformas, y dado que 4F2hc es una glicoproteína, se ha procedido a la desglicosilación de la proteína (Figura 11). Tanto el tratamiento con tunicamicina durante 24 h como con endoglicosidasa F dan lugar a un patrón de bandas similar, manteniéndose una banda de menor movilidad electroforética que puede corresponder a proteína glicosilada antes de la adición de tunicamicina. De hecho, esta banda desaparece cuando se incrementan los tiempos de incubación con ese inhibidor, probablemente debido al *turnover* de la proteína. A 96 h el patrón de bandas es más complicado, al existir un mayor número de formas desglicosiladas. El tratamiento de las células con tunicamicina a 96 h seguido de la desglicosilación enzimática, da lugar a la aparición de dos bandas mayoritarias a 53 y 60 kDa, y una minoritaria de unos 90 kDa. En la base de datos *Protein* (NCBI) se describe la potencial existencia de distintas isoformas de la proteína. Por lo tanto, estas bandas obtenidas tras la glicosilación podrían corresponder a dos isoformas de la proteína que difieren en 10 kDa y que coinciden con la masa molecular de las potenciales isoformas recogidas en la base de datos.



**Figura 11. Desglicosilación de 4F2hc en células HeLa.** Las proteínas de extractos celulares que se digieren con endoglicosidasa F (Endo F) o H (Endo H) o los procedentes de las células cultivadas en presencia de tunicamicina (10 µg/ml) a diferentes tiempos, se separan mediante PAGE-SDS al 10% en condiciones reductoras y se someten a *Western blot* para detectar la expresión de 4F2hc.

inducción significativa de la expresión de la MMP-9 tanto en las células control como en las silenciadas. Ello apunta en este caso, a que la inducción de la expresión de la MMP-2 en las células HeLa no viene determinada por el estado de activación de ERK1/2.

Estudios realizados por el grupo del Dr. Palacín sobre el gen *SLC3A2* que codifica 4F2hc, reveló la existencia de otros potenciales lugares de iniciación de la transcripción o de variantes de *splicing* alternativo, que podrían dar cuenta de distintas isoformas de la proteína, pudiendo incluso estar relacionadas con el desarrollo tumoral. Con el fin de confirmar la existencia de alguna de estas isoformas, y dado que 4F2hc es una glicoproteína, se ha procedido a la desglicosilación de la proteína (Figura 11). Tanto el tratamiento con tunicamicina durante 24 h como con endoglicosidasa F dan lugar a un patrón de bandas similar, manteniéndose una banda de menor movilidad electroforética que puede corresponder a proteína glicosilada antes de la adición de tunicamicina. De hecho, esta banda desaparece cuando se incrementan los tiempos de incubación con ese inhibidor, probablemente debido al *turnover* de la proteína. A 96 h el patrón de bandas es más complicado, al existir un mayor número de formas desglicosiladas. El tratamiento de las células con tunicamicina a 96 h seguido de la desglicosilación enzimática, da lugar a la aparición de dos bandas mayoritarias a 53 y 60 kDa, y una minoritaria de unos 90 kDa. En la base de datos *Protein* (NCBI) se describe la potencial existencia de distintas isoformas de la proteína. Por lo tanto, estas bandas obtenidas tras la glicosilación podrían corresponder a dos isoformas de la proteína que difieren en 10 kDa y que coinciden con la masa molecular de las potenciales isoformas recogidas en la base de datos.



**Figura 11. Desglicosilación de 4F2hc en células HeLa.** Las proteínas de extractos celulares que se digieren con endoglicosidasa F (Endo F) o H (Endo H) o los procedentes de las células cultivadas en presencia de tunicamicina (10 µg/ml) a diferentes tiempos, se separan mediante PAGE-SDS al 10% en condiciones reductoras y se someten a *Western blot* para detectar la expresión de 4F2hc.



### 4.1.3. 4F2hc y tumorigénesis en adenocarcinoma de colon

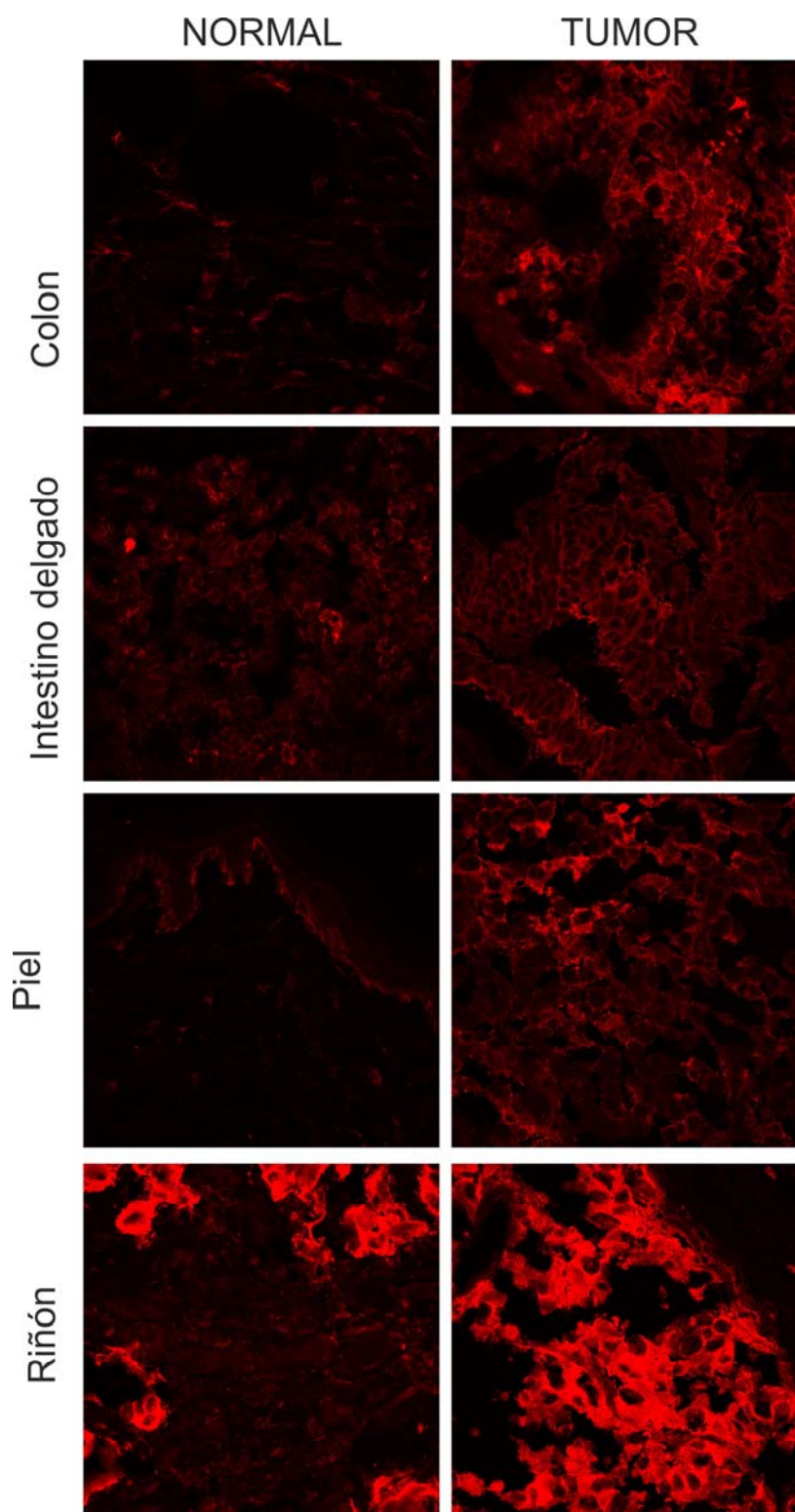
Unos niveles elevados de expresión de 4F2hc se han correlacionado con tejidos muy proliferativos. Además, esta proteína se considera un marcador de activación de la proliferación en linfocitos así como en queratinocitos basales. Incluso su sobreexpresión está relacionada con el desarrollo, la progresión y el potencial metastásico de los tumores, lo que es debido a su interacción con las integrinas  $\beta 1$  y la modulación de su señalización. La proteína 4F2hc se considera un potencial oncogén así como un indicador de mal pronóstico y una posible diana terapéutica (Hara y col., 1999; Esseghir y col., 2006).

4F2hc se expresa en todos los tipos celulares con la excepción de las plaquetas, y lo hace aún más en tejidos con una alta tasa de proliferación como en el tracto gastrointestinal y en los túbulos del riñón (Rossier y col., 1999; Dave y col., 2004). Además la sobreexpresión de esta proteína está relacionada con la transformación maligna (Hara y col., 1999; Henderson y col., 2004).

Como datos previos, se debe apuntar que en el grupo del Dr. Palacín se procedió al análisis de muestras de tejidos embebidos en parafina procedentes del banco de tumores del Hospital Clínico de Barcelona (Dr. J.A. Fernández) con el anticuerpo anti-4F2 humano (Dr. F. Sánchez-Madrid). Se observó la sobreexpresión de 4F2hc en varios tumores (adenocarcinoma de colon, carcinoma adenoescamoso de la glándula salival, adenocarcinoma no diferenciado de estómago y hepatocarcinoma no diferenciado). De particular relevancia es la sobreexpresión de 4F2hc en cáncer colorrectal; de hecho, en 17 de 18 muestras de tumores con bajo, medio y elevado potencial metastásico de adenocarcinoma de colon se ha observado una sobreexpresión de 4F2hc (inmunohistoquímica y *Western blot*). Por ello, se ha analizado la expresión de 4F2hc en células de adenocarcinoma de colon establecidas en nuestro grupo así como en otras líneas celulares comerciales.

#### *Expresión de 4F2hc en tejidos tumorales*

Con el fin de confirmar la ubicuidad y sobreexpresión de 4F2hc, inicialmente se ha utilizado una batería de tejidos tumorales (*array* de tejidos comercial) cuya ventaja se centra en disponer de tejidos normales y tumorales. Como se observa en la Figura 12 todos los tejidos normales expresan 4F2hc en menor o mayor grado. En la piel se puede apreciar que la expresión de la proteína está restringida al estrato basal, en el que se encuentran las células con capacidad altamente proliferativa. La transformación



**Figura 12. Expresión de 4F2hc en distintos tejidos.** Las secciones de tejidos normales y tumorales, que han sido fijadas con acetona fría sobre un portaobjetos, se dejan descongelar a temperatura ambiente y se lleva a cabo una inmunotinción con el anticuerpo anti-4F2hc FG1/8 siguiendo el protocolo descrito para las inmunofluorescencias. Las preparaciones se observan por microscopía confocal. Aquí se muestra una selección de las parejas de tejidos normal/tumoral. Los datos del *array* se recogen en la Tabla V.

maligna en cada tejido conduce a un incremento en la expresión de 4F2hc, cuando se compara con el correspondiente tejido normal. En este caso, el patrón de expresión de la proteína es variable, siendo difuso en el caso del hígado, mientras que se localiza en las uniones célula-célula en otros tejidos tumorales como mama, intestino y riñón (Tabla V).

**Tabla V. Expresión de 4F2hc en tejidos**

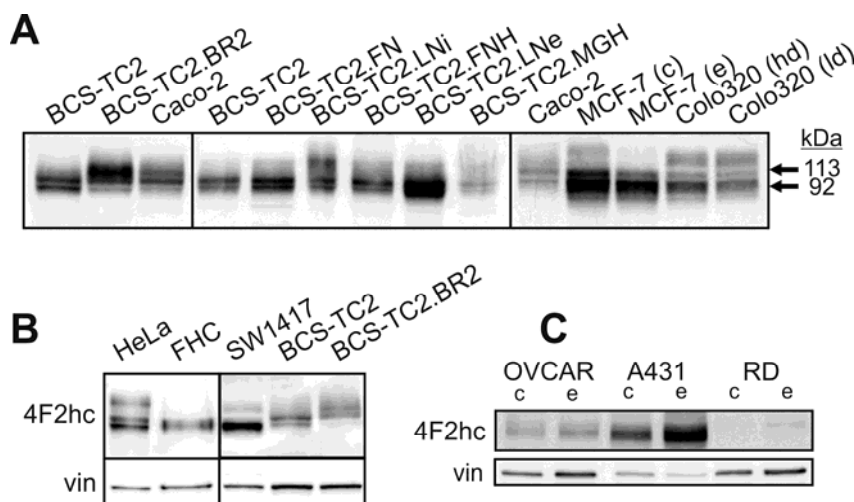
	Normal	Tumor
<i>Cerebro</i>	+	++++
<i>Mama</i>	+	+++
<i>Colón</i>	+	++++
<i>Músculo esquelético</i>	-/+	++++
<i>Riñón</i>	++	++++
<i>Hígado</i>	++	++++
<i>Pulmón</i>	-	+++
<i>Páncreas</i>	-	-
<i>Próstata</i>	¿?	¿?
<i>Piel</i>	+	++++
<i>Intestino delgado</i>	++	++++
<i>Estómago</i>	-	++
<i>Ovario</i>	+	++
<i>Útero</i>	+	++++

Las secciones normales y tumorales de los tejidos se clasifican en función de grado de tinción.

### *Expresión de 4F2hc en células en cultivo*

Dado que la sobreexpresión de 4F2hc está ligada con la adquisición de un fenotipo maligno, se ha valorado la expresión de 4F2hc en una batería de líneas celulares mediante *Western blot*. Se han seleccionado distintas células de adenocarcinoma de colon humano que se caracterizan por presentar diferente capacidad tumorigénica y grado de diferenciación; éstas fueron establecidas por el grupo de investigación o se trata de líneas celulares comerciales de igual o diferente origen que están recogidas en la Tabla III. De forma resumida se enumeran a continuación algunas de las características de dichas células. Las células BCS-TC2, células parentales, proceden de un adenocarcinoma de colon humano poco diferenciado; son de origen epitelial, poseen un bajo grado de diferenciación y no son tumorigénicas en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Turnay y col., 1990). A partir de dichas células, por coinyección subcutánea de las células BCS-TC2 con fibronectina, se han obtenido tumores de los que se han establecido las células BCS-TC2.FN (López-Conejo

y col., 2002). En el caso de la coinyección con la laminina se obtuvieron dos tipos de células, las procedentes de las capas internas de los tumores (BCS-TC2.LNi) y las de la capa externa de los mismos (BCS-TC2.LNe). Las coinyecciones ortotópicas en el bazo de ratones atímicos de las células parentales con matrigel o fibronectina rindieron, en cada caso, tumores hepáticos de los que se obtuvieron las células BCS-TC2.MGH y BCS-TC2.FNH, respectivamente. Todas estas sublíneas muestran actividad tumorigénica intrínseca. Asimismo, la sublínea celular tumorigénica BCS-TC2.BR2 se obtuvo tras el cultivo continuado de las células parentales en presencia de butirato (López de Silanes y col., 2004). Además, se emplearon otras líneas de adenocarcinoma de colon humano como SW1417 (no tumorigénicas), Colo320 (que se caracterizan por crecer en suspensión) y Caco-2, una de las líneas celulares de referencia en el estudio del cáncer de colon de acuerdo con la literatura. Asimismo, se utilizaron las células fetales humanas FHC derivadas de epitelio colónico normal. Como se muestra en la Figura 13A todas las líneas celulares analizadas expresan 4F2hc, si bien el nivel de expresión de 4F2hc varía entre ellas (Figura 13B) y se observa una distinta movilidad electroforética de la proteína, lo que puede deberse a diferencias en el patrón de glicosilación.

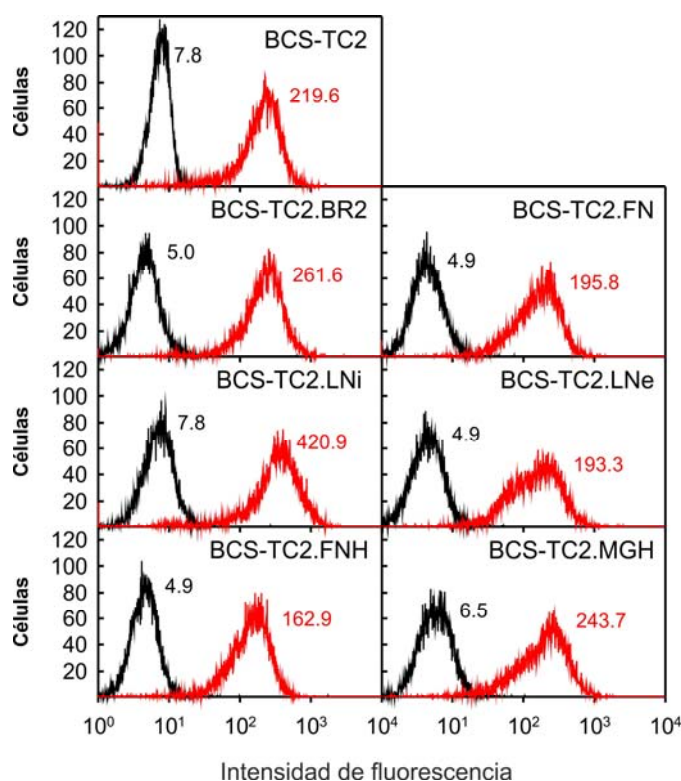


**Figura 13. Expresión de 4F2hc en distintas líneas tumorales.** Extractos totales de distintas líneas celulares se separan mediante PAGE-SDS al 10% en condiciones reductoras y se someten a *Western blot* para detectar la expresión de 4F2hc. (A) Células de adenocarcinoma de colon, excepto las MCF-7 (cáncer de mama). (B) Comparación de la expresión utilizando células tumorigénicas (BCS-TC2.BR2 y HeLa) y no tumorigénicas (FHC, SW1417 y BCS-TC2). (C) Expresión de 4F2hc en células de distinto origen tisular y en distinta fase de crecimiento (c, confluyente; e, exponencial).

La expresión de 4F2hc en las células BCS-TC2 da lugar a dos de bandas alrededor de 85 y 90 kDa, respectivamente. En cambio, en las células BCS-TC2.BR2 y Caco-2, el patrón de expresión se corresponde con 2 bandas de menor movilidad electroforética en torno a 95 y 110 kDa. Sin embargo, las sublíneas celulares derivadas de las células BCS-TC2, muestran que la expresión de 4F2hc se corresponde con dos bandas de masa molecular similar a las encontradas en las células parentales. Las células tumorigénicas BCS-TC2.LNe, que presentan un menor grado de diferenciación (similar al de las células parentales), son las que presentan mayores niveles totales de 4F2hc, seguidas de las células BCS-TC2.BR2 (diferenciadas) (Figura 13A). Además la expresión de 4F2hc varía en función de las condiciones del cultivo dentro de una misma línea celular. Se observa que existe una disminución de la expresión de la glicoproteína en células Caco-2 confluentes, mientras que en las células MCF-7 y Colo320 (éstas últimas crecen en suspensión) la expresión es mayor a la densidad de saturación (Figura 13A). El uso de células normales FHC, que recuerdan a las células procedentes de un epitelio colónico normal, revela la expresión de 4F2hc como una banda mayoritaria de 85 kDa, al igual que ocurre al valorar la expresión de 4F2hc en células de adenocarcinoma de colon no tumorigénicas SW1417 (Figura 13B). Esta banda de 85 kDa se corresponde con la banda de mayor movilidad electroforética en las células BCS-TC2 y las sublíneas derivadas (excepto BCS-TC2.BR2). Al comparar con el patrón de expresión de 4F2hc en las células HeLa (con un fenotipo maligno más agresivo) se observan las dos bandas características de 85 y 90 kDa, y una tercera de menor movilidad electroforética que se encuentra por encima de los 110 kDa y que no se había observado con anterioridad (Figura 13B). Asimismo, se ha comprobado la dependencia de la expresión de 4F2hc de la fase de crecimiento del cultivo en células A431, mientras que diferencias en la expresión son inapreciables en las células OVCAR y RD (Figura 13C).

Dado que la valoración de los niveles totales de 4F2hc no aclara su relación con el fenotipo maligno y el grado de diferenciación en células de adenocarcinoma de colon, se ha determinado la expresión de la proteína en la superficie celular mediante citometría de flujo (Figura 14). Al comparar los valores de intensidad media (*MFI*, *Mean Fluorescence Intensity*) obtenidos, no se observan diferencias significativas en cuanto al nivel de proteína expresado en la membrana plasmática ni, por tanto, con el grado de malignidad, exceptuando la mayor expresión en las células tumorigénicas y diferenciadas BCS-TC2.LNi. Por lo tanto, en este sistema modelo de células de

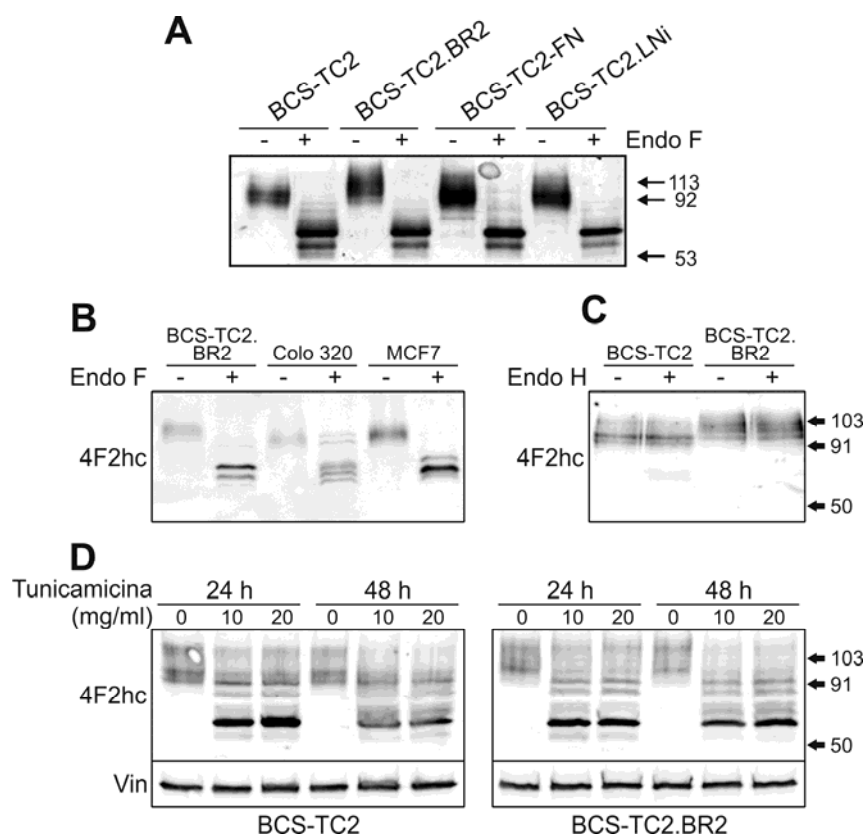
adenocarcinoma de colon no se ha encontrado una correlación clara entre la expresión de 4F2hc y la tumorigenicidad o el grado de diferenciación.



**Figura 14. Detección de 4F2hc en células de adenocarcinoma de colon con distinto grado de diferenciación y capacidad tumorigénica mediante citometría de flujo.** En cada panel se representa en negro la fluorescencia control tras la incubación de las células en presencia únicamente del segundo anticuerpo y, en rojo, la fluorescencia específica debida a 4F2hc. Asimismo, se indican los valores numéricos de MFI obtenidos en cada caso.

El variable patrón de expresión de 4F2hc en las distintas líneas celulares junto a los hallazgos del grupo del Dr. Palacín acerca de la existencia de sitios de iniciación de la transcripción alternativos en el gen *SLC3A2*, ha llevado a pensar en la existencia de posibles isoformas de la proteína que pudiesen estar implicadas en la adquisición del fenotipo maligno. El C-terminal de 4F2hc contiene 4 residuos de asparagina que podrían sufrir glicosilación (Deves y Boyd, 2000). Por lo tanto, se ha evaluado la expresión de 4F2hc tras la desglicosilación de la proteína bien por tratamiento con endoglicosidasas o/y bien evitando la glicosilación de la proteína sintetizada *de novo* por tratamiento con tunicamicina (inhibe la primera enzima de la ruta de N-glicosilación) (Figura 15). En la Figura 15A se recoge la desglicosilación mediante el tratamiento con la endoglicosidasa F de distintas líneas celulares de adenocarcinoma

de colon. Se puede apreciar que la desglicosilación genera una banda mayoritaria alrededor de 70 kDa y una banda menos intensa alrededor de 60 kDa. Además este patrón de bandas se repite cuando se emplean células de adenocarcinoma de colon en suspensión (Colo 320) así como células de distinto origen como las MCF-7 (Figura 15B). Sin embargo, la intensidad de las bandas es dependiente de la línea celular. Asimismo se observa que el tratamiento de extractos celulares con endoglicosidasa H no afecta a 4F2hc, indicando que entre las modificaciones sufridas por la proteína no se encuentran oligosacáridos ricos en manosa (Figura 15C).



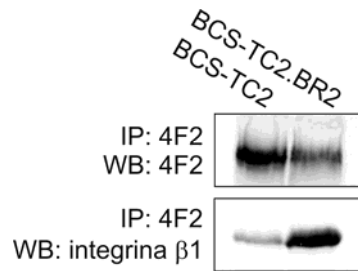
**Figura 15. Desglicosilación de 4F2hc en células de adenocarcinoma de colon.** Extractos celulares procedentes de células de adenocarcinoma de colon con distinto grado de diferenciación y tumorigenicidad o bien las células MCF-7 de origen mamario digeridos con endoglicosidasa F (Endo F) (A,B) o endoglicosidasa H (C). (D) Análisis de la expresión de 4F2hc en células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 tras el tratamiento con tunicamicina, se separan mediante PAGE-SDS al 10% en condiciones reductoras y se valora la expresión de 4F2hc por *Western blot*.

Adicionalmente, ya que pueden existir núcleos de azúcares provenientes de la N-glicosilación de la proteína que la endoglicosidasa F no sea capaz de eliminar, se trataron las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 (que mostraban un distinto patrón de

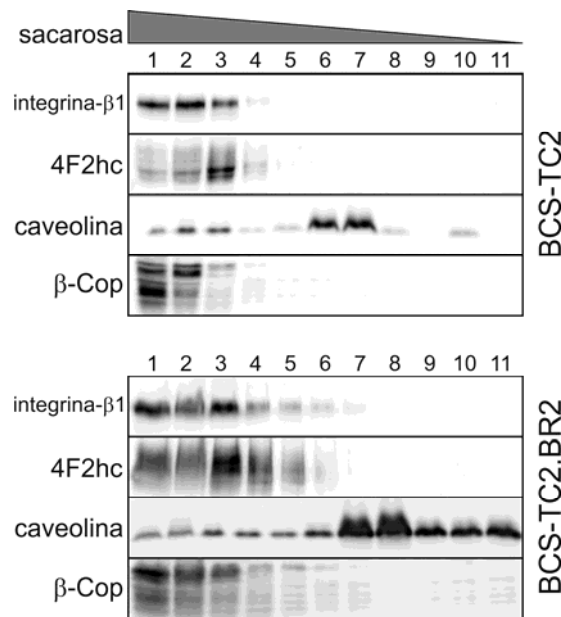
glicosilación) a distintos tiempos con tunicamicina (Figura 15D). En ambos tipos celulares se detectan bandas de menor movilidad electroforética, que se corresponden con la desglicosilación parcial de la proteína. En este caso se observa una banda mayoritaria aproximadamente 60 kDa que, además de concordar con la masa molecular teórica de 4F2hc, también coincide con la banda de menor movilidad encontrada tras la desglicosilación de la proteína en las células HeLa. Al contrario que en estas últimas, en las células de adenocarcinoma de colon no se observan bandas adicionales que hicieran suponer la existencia de isoformas de 4F2hc en estas células. Por lo tanto, el patrón diferencial de expresión de 4F2hc en las líneas celulares empleadas no puede asegurarse que sea debido a la presencia de isoformas de la proteína, sino que parece ser el resultado de un distinto grado de glicosilación. De hecho, el proceso de glicosilación se ve alterado a menudo durante la transformación oncogénica (Hakomori, 1996). Se han descrito varios cambios estructurales en los glicanos tumorales, incluyendo aumento del nivel de truncación y ramificaciones de estructuras así como un aumento en la expresión de secuencias terminales inusuales (Kim y Varki, 1997).

La modulación de la señalización integrina por 4F2hc, para lo que se requiere su asociación con las integrinas  $\beta 1$ , parece ser crítica en el proceso tumorigénico (Rintoul y col., 2002; Henderson y col., 2004; Feral y col., 2005). Se ha confirmado esta interacción en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 mediante inmunoprecipitación empleando el anticuerpo anti-4F2 C-13 presente en el líquido ascítico obtenido en ratones BALB/c preparados con pristano como describen Fenczik y col. (2001) (Figura 16). La naturaleza de esta interacción ocurre en la membrana celular, concretamente en dominios de membrana de baja densidad o *rafts* (Kolesnikova y col., 2001). Por ello, se han realizado gradientes de densidad de sacarosa para comprobar la localización de ambas proteínas en la membrana plasmática de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 (Figura 17). La expresión de 4F2hc no se observa en las fracciones que corresponden a los microdominios de membrana de baja densidad (fracciones 6 a 8). Éstos son en los que se localiza la proteína caveolina-1 (marcador de caveolas, un tipo articular de *raft*). La posición de 4F2hc queda restringida a las fracciones de mayor densidad, en las que se encuentra el coátomero  $\beta$ , una proteína asociada al retículo endoplásmico. Del mismo modo, las integrinas  $\beta 1$  se detectan en las fracciones densas. Por consiguiente, la interacción entre 4F2hc e integrina  $\beta 1$  no parece tener lugar en dominios de membrana de baja densidad.



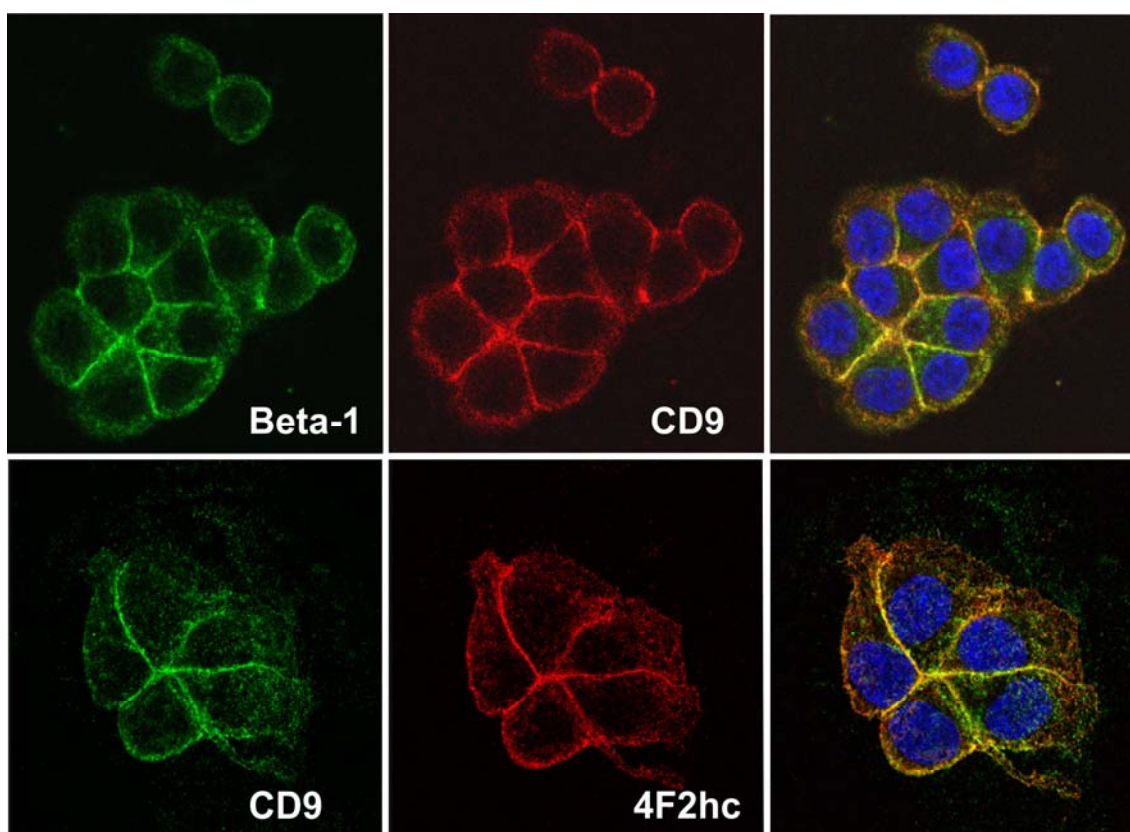


**Figura 16. Interacción de 4F2hc y la integrina  $\beta 1$ .** Se realiza una inmunoprecipitación a partir de lisados de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 empleando un anticuerpo anti-4F2hc. Las proteínas se separan por PAGE-SDS y se someten a *Western blot*. Se muestra un experimento representativo, pero la presencia de la integrina  $\beta 1$  en los inmunocomplejos se ha observado tanto empleando el anticuerpo comercial como el obtenido en el fluido ascítico.



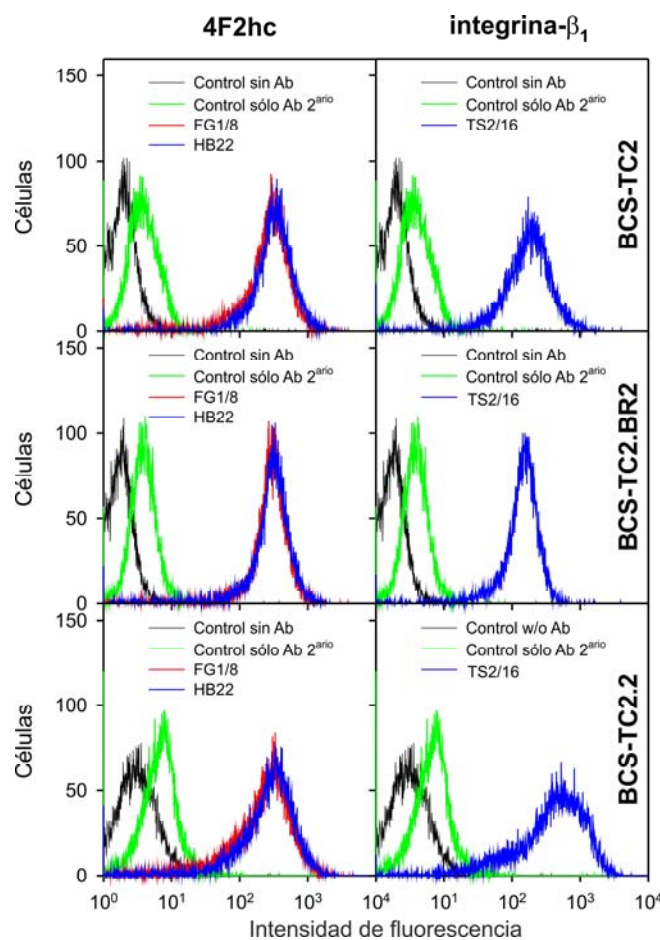
**Figura 17. Localización de 4F2hc e integrina  $\beta 1$  en la membrana de células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.** Las células se lisan en tampón MES en presencia de inhibidores de proteasas y se separan mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Las proteínas recogidas en cada fracción se precipitan con acetona: metanol y se analizan por PAGE-SDS y *Western blot*. Como marcador de *rafts* se emplea caveolina y como marcador de dominios de membrana de alta densidad el coatómero  $\beta$  ( $\beta$ -Cop), presente en el sistema de endomembranas (retículo endoplasmático y aparato de Golgi).

Otra de las proteínas que interacciona con las integrinas  $\beta 1$  es la tetraspanina CD9 (Gutiérrez-López y col., 2003), proteína que también está implicada en tumorigenicidad (Ovalle y col., 2007). Mediante microscopía confocal se ha observado la asociación de ambas moléculas en las células BCS-TC2 y se ha detectado la colocalización de 4F2hc con la tetraspanina CD9 (Figura 18). Esta potencial asociación de 4F2hc con la red de tetraspaninas intentó confirmarse mediante inmunoprecipitación. Sin embargo, no se observó la formación del inmunocomplejo 4F2hc-CD9, o viceversa, en células BCS-TC2 y BCS.TC2.BR2 empleando Triton-X100 como detergente. Así, 4F2hc podría estar formando parte de la red de tetraspaninas, pero no por interacciones directas con CD9, sino mediante interacciones secundarias o terciarias con otras proteínas que forman parte de estos dominios de membrana enriquecidos en tetraspaninas.



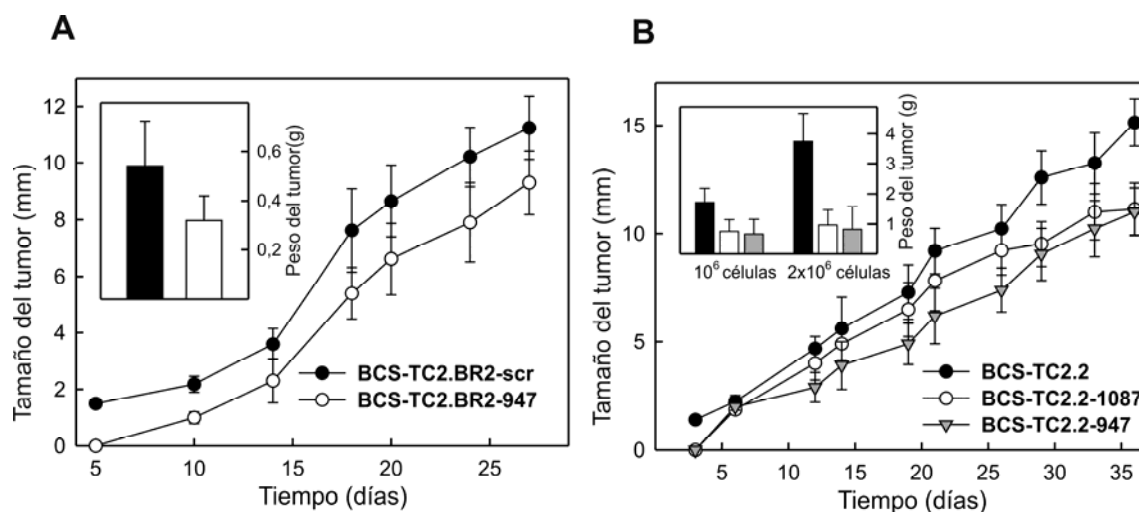
**Figura 18. Distribución de 4F2hc, CD9 y la cadena  $\beta 1$  de integrinas en las células BCS-TC2.** Las células se siembran sobre cubreobjetos y, tras tres días, se lava la monocapa y se procede a la incubación de las muestras con los correspondientes anticuerpos. Las preparaciones se observan por microscopía confocal. En la parte superior se observan las imágenes correspondientes a la tinción con anti-integrina  $\beta 1$  o anti-CD9, y en la inferior con éste último anticuerpo o anti-4F2hc. En ambos casos, en la parte derecha de la figura se recoge la superposición de los dos marjajes.

Dada la relación existente entre 4F2hc, integrina  $\beta_1$  y tumorigenicidad, se ha valorado la expresión de ambas proteínas en las células BCS-TC2, BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.2 (Figura 19). La expresión de 4F2hc parece similar en las tres líneas celulares con valores de MFI alrededor de 300. Sin embargo, no ocurre lo mismo con la expresión de la integrina  $\beta_1$ , donde los valores de MFI obtenidos son 219, 162 y 563 para las células BCS-TC2, BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.2, respectivamente. La mayor expresión de la integrina  $\beta_1$  estas últimas células ya se había observado previamente en el laboratorio, lo que está relacionado con su mayor capacidad tumorigénica respecto de las células parentales (López-Conejo y col., 1996).



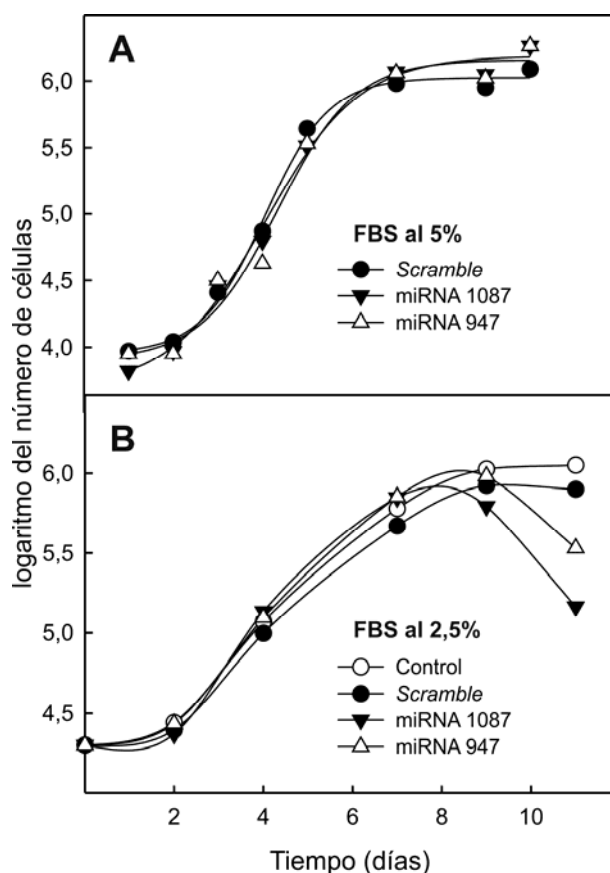
**Figura 19.** Expresión de 4F2hc y de la cadena  $\beta_1$  de integrinas en células de adenocarcinoma de colon. La expresión de estas proteínas se analiza en las células BCS-TC2, BCS-TC2.BR2 y las BCS-TC2.2 por citometría de flujo. En cada panel se representa en negro la fluorescencia control intrínseca de las células en ausencia de anticuerpo, en verde la obtenida tras la incubación de las células en presencia únicamente del segundo anticuerpo y, en rojo y/o azul, la fluorescencia específica debida a 4F2hc o a la cadena de integrina  $\beta_1$ .

En las células BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.2 se ha procedido a silenciar la expresión de 4F2hc mediante 2 miRNA (947 o 1087) o una secuencia *scramble* (scr) empleando un sistema de vectores lentivirales derivados del VIH. Una vez seleccionadas las células y obtenidos unos niveles de represión significativos y estables de 4F2hc, se evaluó la tumorigenicidad *in vivo* de las células silenciadas (Figura 20). El silenciamiento de 4F2hc en las líneas tumorigénicas BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.2 no afecta a la incidencia del desarrollo del tumor. Las células *scramble* se comportan de forma similar a las células sin transducir. Sin embargo, las células silenciadas muestran una reducción del tamaño de los tumores a lo largo del crecimiento tumoral que, además, queda patente al determinar el peso de los tumores (Figuras 20A y 20B). Asimismo, los tumores derivados de las células BCS-TC2.2 tienen un mayor peso que los procedentes de las células BCS-TC2.BR2. Se observa una reducción de tamaño de los tumores desarrollados por las células BCS-TC2.BR2-947 de aproximadamente un 59%; en las células BCS-TC2.2-947 y -1087 se reduce al 38 y 43% en el caso de la inyección de  $10^6$  células y al 22 y 25% cuando se inyectan  $2 \times 10^6$  células. Aunque la velocidad de crecimiento parece similar, la fase de latencia es mayor en las células silenciadas al igual que ocurre en las células HeLa.



**Figura 20. Tumorigenicidad *in vivo* tras la represión de la expresión de 4F2hc en células de adenocarcinoma de colon humano.**  $10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS se inyectan subcutáneamente a ambos lados en la región lumbar de ratones atímicos. Una vez detectada la formación de tumor, el tamaño de los tumores (media de la dimensión máxima y su perpendicular) se mide con un calibre dos veces por semana. Los valores son la media de 8 tumores en cada caso. El tamaño de los tumores se evalúa a lo largo de 27 días en (A) células BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.BR2-947 y de 35 días en (B) células BCS-TC2.2-scr, BCS-TC2.2-947 y BCS-TC2.2-1087, y. El peso de los tumores obtenidos se recoge en los insertos de las figuras. En el caso de las células BCS-TC2.2 normales y silenciadas se indican también los valores obtenidos al inyectar  $2 \times 10^6$  células.

Estudios de proliferación *in vitro* de las células BCS-TC2.BR2-scr y sus derivadas silenciadas, cuyo porcentaje de silenciamiento de 4F2hc es el mayor obtenido en las células de adenocarcinoma de colon (~60-80%), indican que la velocidad de proliferación y la densidad de saturación son similares entre las tres líneas celulares (Figura 21A), lo que está de acuerdo con los resultados de proliferación *in vivo*. No obstante, las células silenciadas muestran un comportamiento diferente cuando se restringe la concentración de suero (Figura 21B). A una concentración de suero del 5%, habitualmente empleada para el mantenimiento del cultivo, la represión de 4F2hc no afecta a la proliferación. Sin embargo, en condiciones restrictivas de suero (2,5%) se observa un comportamiento diferente de las células silenciadas en la fase de saturación. Estas células se afectan por la menor disposición de factores crecimiento y/o nutrientes, a diferencia de las células control y *scramble*, y consecuentemente, mueren. Ello pone de manifiesto la necesidad de nutrientes y de factores de crecimiento que requieren las células en las que se ha silenciado 4F2hc, lo que podría relacionarse con función transportadora de aminoácidos.



**Figura 21. Curvas de proliferación *in vitro* de células de adenocarcinoma de colon humano tras el silenciamiento de 4F2hc.** Se siembran  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio completo (A) o en medio con restricción de suero (2,5% FBS) (B) y, a diferentes tiempos, se tripsinizan las células y determina el número de células en un hemocitómetro. Se representan los valores medios siendo el error inferior al 10%.

En este segundo bloque de resultados se presentan de forma breve aquéllos que ya han sido publicados, y cuyos trabajos se recogen en el Anexo 1, y de forma más extensa los datos originales sobre transmisión de señales.

## 4.2. EFECTOS DE COMPONENTES DEL LUMEN INTESTINAL SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON

El mantenimiento de la fisiología normal del epitelio intestinal requiere un controlado balance entre proliferación, diferenciación y apoptosis. Este epitelio simple se encuentra expuesto a una amplia variedad de agentes que pueden afectar a estos procesos induciendo respuestas inflamatorias o, incluso, transformación maligna. Entre ellos cabe destacar al butirato, producto de la fermentación anaeróbica de la fibra de la dieta. Además de ser la principal fuente de energía de los colonocitos, el butirato regula la homeostasis del epitelio colónico e induce diferenciación y apoptosis sobre células transformadas, protegiéndolo así de la carcinogénesis colorrectal. Además, otros agentes con efectos citotóxicos, como los ácidos biliares o productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), se encuentran normalmente en el lumen colónico. La adquisición de resistencia a los efectos apoptóticos o citotóxicos de estos agentes es un mecanismo empleado por las células tumorales para eludir el control fisiológico y así avanzar en el proceso tumoral, constituyendo un gran obstáculo en la terapia anticancerígena.

### 4.2.1. Adquisición de resistencia a butirato

Se analizó si la resistencia a la apoptosis inducida por butirato proporciona un fenotipo resistente generalizado frente a distintos estímulos apoptóticos comparando las respuestas de las células parentales BCS-TC2 y las resistentes a butirato BCS-TC2.BR2. Los datos obtenidos se recogen en el trabajo publicado:

Nieves Olmo, Javier Turnay, Emilio Lecona, Marta García-Díez, Beatriz Llorente, Angélica Santiago-Gómez, M<sup>a</sup> Antonia Lizarbe. «Acquisition of resistance to butyrate induces resistance to luminal components and other types of stress in human colon adenocarcinoma cells» *Toxicology in Vitro*, **21**: 254-261 (2007)

Se planteó si la resistencia a la apoptosis inducida por butirato proporciona resistencia a los efectos apoptóticos causados por otros componentes del lumen intestinal, como los ácidos biliares y productos bacterianos, así como por choque

térmico y estrés osmótico. Las células BCS-TC2.BR2 tienen un nivel basal de las proteínas de choque térmico HSP60 y HSP70 mayor que las células parentales. Ello puede contribuir a la resistencia que presentan estas células ante un choque térmico suave, mientras que la viabilidad de las células BCS-TC2 disminuye alrededor de un 20% con este tratamiento. Cuando las células se someten a un choque térmico severo, la viabilidad de las células parentales se reduce alrededor de un 60%, mientras que sólo se observa una pequeña disminución en la de las células resistentes. En ambos tipos de células se observa una inducción acusada de los niveles de HSP70 que se mantienen tras 24 h de recuperación, detectándose una mayor inducción en las células BCS-TC2 que alcanza un máximo 2 h después del tratamiento. Asimismo, se ha comprobado que la resistencia a butirato está asociada a un fenotipo resistente generalizado. Las células BCS-TC2.BR2 casi no se afectan por el tratamiento con DCA pero el CDCA induce apoptosis aunque en mucha menor medida que en las células sensibles a butirato. Estas células también son menos sensibles al LPS, al contrario que ocurre con las células parentales donde la pérdida de viabilidad se correlaciona con un aumento del porcentaje de células apoptóticas. La viabilidad de las células es bastante similar tras estrés hiperosmótico, si bien el incremento de la activación de ERK1/2 en las células parentales es superior al de las células resistentes a butirato. Estos efectos están de acuerdo con los resultados obtenidos tras el análisis comparativo de la expresión génica entre las dos líneas celulares, que ha revelado que entre los mecanismos responsables de la resistencia a butirato se encuentra el cambio en la expresión de genes relacionados con estrés y apoptosis. Por lo tanto, la adquisición de resistencia a butirato promueve la aparición de un fenotipo resistente a los efectos de otros componentes del lumen intestinal así como de otros tipos de estrés.

### **Aportación personal**

En este trabajo se ha colaborado en el análisis y la clasificación de los genes cuya expresión varía entre las células resistentes y sensibles a butirato. Además se ha colaborado en la cuantificación de las células apoptóticas y necróticas por microscopía confocal tras el tratamiento con ácidos biliares.

#### 4.2.2. Transporte de butirato en células de adenocarcinoma de colon

Para llevar a cabo sus efectos sobre proliferación, diferenciación y apoptosis, el butirato producido en el lumen colónico debe entrar en el colonocito. De hecho, estos efectos son dependientes de su concentración intracelular, que es regulada por su transporte. Se han descrito dos mecanismos para el transporte de este agente al interior de las células epiteliales intestinales: la difusión pasiva no iónica de la forma no disociada y un transporte específico de la forma aniónica mediado por transportador, siendo este último el principal mecanismo en la captura del butirato. La disminución del transporte de butirato en células malignas reduciría su concentración efectiva intracelular y, por tanto, escaparían de los efectos apoptóticos inducidos por este agente, promoviendo la carcinogénesis. Por ello, se ha analizado la captura de butirato en células de adenocarcinoma de colon humano. Los resultados se recogen en el artículo:

Emilio Lecona, Nieves Olmo, Javier Turnay, [Angélica Santiago-Gómez](#), Isabel López de Silanes, Myriam Gorospe, M<sup>a</sup> Antonia Lizarbe. «*Kinetic analysis of butyrate transport in human colon adenocarcinoma cells reveals two different carrier-mediated mechanisms*». *Biochemical Journal*, **40**: 311-320 (2008)

Se ha caracterizado la captura de butirato en las células BCS-TC2 y en la sublínea resistente a butirato, BCS-TC2.BR2. Este análisis se ha extendido a otras células de adenocarcinoma de colon, como HT-29 y Caco-2, así como a las células de colon fetal normal (FHC). En todas líneas celulares se ha descrito la co-existencia de dos mecanismos distintos que participan en el transporte de butirato mediado por transportador, posibilitando la captura de butirato a distintas concentraciones: un sistema de baja afinidad/alta capacidad con una  $K_m \sim 100\text{mM}$ , y un sistema de alta afinidad/baja capacidad con una  $K_m$  en el rango de micromolar. El valor de  $K_m$  es similar en las líneas celulares, si bien difieren en la velocidad máxima de captura. Las células Caco-2 confluentes son las que muestran un mayor valor de velocidad máxima de captura del butirato, mientras que el menor lo registran las células BCS-TC2. El uso de análogos de sustrato, inhibidores específicos, variaciones de pH y diferentes concentraciones de bicarbonato y sodio ha permitido establecer las propiedades de cada transporte. En el transporte de baja afinidad, que tiene lugar a altas concentraciones de butirato, actúa un intercambiador de aniones; concretamente ocurre



un antiporte butirato/bicarbonato, con una posible contribución de AE2 y MCT4. En cambio, a bajas concentraciones de butirato tiene lugar el transporte de alta afinidad mediado por un cotransporte  $H^+$ /monocarboxilato que es dependiente de energía y se activa por PKC $\delta$ . El efecto de los análogos estructurales, el pH y los inhibidores sugieren la potencial implicación de MCT1 en este transporte. Para verificarlo, se ha procedido al silenciamiento de la expresión de MCT1 empleando dos siRNA específicos, lográndose un 70% de disminución de la expresión de la proteína. De forma paralela, se ha observado una disminución de la captura de butirato de entre un 33 y un 45%, dependiendo del siRNA. Además, el tratamiento de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 con butirato a distintos tiempos y concentraciones promueve un aumento de la expresión de MCT-1, a la vez que se incrementa la captura de butirato, necesitándose en las células resistentes mayores concentraciones o tiempos de exposición del agente. En resumen, se ha descrito por primera vez la existencia de dos mecanismos específicos para la captura de butirato en células de adenocarcinoma de colon que cooperan para facilitar su captura a altas y bajas concentraciones de butirato, manteniendo la funcionalidad celular. El transporte de alta afinidad/baja capacidad, está probablemente mediado por MCT1 y podría ser relevante para la supervivencia de las células en regiones tumorales en las que la disponibilidad de glucosa y butirato sea muy pequeña.

### **Aportación personal**

Se ha contribuido a la determinación de la cinética de captura del butirato en células FHC. Asimismo, se ha participado en el estudio del efecto del silenciamiento de MCT1 mediante siRNA sobre la captura de butirato en las células BCS-TC2.

#### 4.2.3. Efectos del butirato sobre la regulación de la expresión génica

Los efectos del butirato son ejercidos a partir de cambios en la expresión génica promovidos principalmente por su acción inhibitoria sobre las HDAC, lo que resulta en una hiperacetilación de histonas en los genes regulados por este agente facilitando la interacción con los factores de transcripción y activando de este modo su expresión. Asimismo, el butirato actúa intracelularmente sobre la acetilación de proteínas no histonas, la metilación del DNA, la fosforilación de histonas, así como la transducción de señales. Dado el efecto anti-tumorigénico que muestra el butirato de forma selectiva sobre las células tumorales, se están empleando derivados del butirato y otros compuestos capaces de inhibir la actividad de las HDAC en clínica como agentes terapéuticos. De ahí la importancia de profundizar en su mecanismo de acción.

En los genes regulados por butirato se han encontrado dos tipos de elementos de respuesta a este agente: por un lado, genes que presentan cajas CCAAT en sus promotores, regulados por NF-Y y c/EBP en respuesta a butirato y a otros inhibidores de las HDAC; por otro lado, los genes que contienen cajas GC en sus promotores, que están principalmente regulados por Sp1/Sp3, como *p21*. Asimismo, en algunos de estos genes se ha identificado una secuencia consenso responsable de la acción del butirato conocida como elemento de respuesta a butirato. La expresión de MMP-11 está asociada con la progresión tumoral y una pobre prognosis. Se ha estudiado el efecto del butirato y la TSA sobre la regulación transcripcional de esta metaloproteínasa. Los resultados obtenidos se recogen en el siguiente trabajo:

Juan Ignacio Barrasa, Nieves Olmo, [Angélica Santiago-Gómez](#), Emilio Lecona, Patrick Anglard, Javier Turnay, M<sup>a</sup> Antonia Lizarbe. «Histone deacetylase inhibitors upregulate MMP11 gene expression through Sp1/Smad complexes in human colon adenocarcinoma cells». *Biochimica et Biophysica Acta*, **1823**: 570-581 (2012)

En relación a la expresión de la MMP-11 en células de adenocarcinoma de colon, el tratamiento con butirato y TSA incrementa la actividad del promotor de esta metaloproteínasa así como su expresión proteica en el medio condicionado de las células BCS-TC2. El análisis de distintas construcciones del promotor ha revelado la existencia de elementos reguladores inhibitorios en regiones distales, uno de ellos corresponde a un sitio AP-1. Además, la principal región reguladora dentro del promotor está localizada entre las posiciones -110/+15 bp. Utilizando ensayos de movilidad en gel y de superretardo, así como de inmunoprecipitación de cromatina, se

ha demostrado que Sp1 se une a las cajas GC en la región proximal del promotor de la MMP-11. El tratamiento con mitramicina A, que interfiere la unión de Sp1, confirma la implicación de este factor de transcripción en la regulación de la transcripción basal, así como en la estimulación de la transcripción de *MMP11* tras el tratamiento con inhibidores de las HDAC. Además, la unión de Sp1 se ha confirmado empleando construcciones en las que los tres posibles sitios de unión del factor de transcripción en la región proximal del promotor (fragmento 0,1-ST3) han sido mutados. Los niveles proteicos de Sp1 no se afectan por el tratamiento con butirato o TSA, así como tampoco lo hace su estatus de acetilación tras los distintos tratamientos. Una banda de unos 50 kDa de una proteína acetilada se identificó como Smad2, proteína con la que forma complejos regulando la transcripción génica. La presencia de Smad2 se ha confirmado en los inmunoprecipitados de Sp1. El tratamiento de las células con inhibidores de las HDAC incrementa la cantidad de Sp1 unido a Smad2, unión que se ha confirmado por ChIP en la región proximal del promotor. La regulación requiere la formación de heterocomplejos Sp1/Smad2, que se estimula por un aumento del estado de acetilación de Smad tras los tratamientos con butirato o TSA fomentando su asociación con Sp1. Por otro lado y dado que los inhibidores de las HDAC pueden regular diferentes vías de señalización de las MAPK, se ha comprobado empleando inhibidores específicos, que ERK1/2 está implicada en la estimulación de *MMP11* por los inhibidores de las HDAC.

### Aportación personal

Se ha participado en la determinación de la expresión de MMP-11 en células de adenocarcinoma de colon por citometría de flujo, en el efecto de la concentración de butirato sobre la actividad luciferasa del fragmento más pequeño que contiene la región proximal del promotor y, por último, se ha contribuido al estudio de la implicación de las MAPK en la activación del promotor de *MMP11* mediada por butirato y TSA, mediante el uso de inhibidores específicos.

#### 4.2.4. Apoptosis inducida por ácidos biliares en células de adenocarcinoma de colon

Las células del epitelio intestinal también están expuestas a otros componentes que participan en la digestión. Los ácidos biliares están implicados en la solubilización y absorción de lípidos, nutrientes y vitaminas liposolubles en el lumen intestinal. Los efectos citotóxicos los ejercen, bien causando daño en la membrana celular debido a sus propiedades tipo detergente, o bien mediante la generación de ROS, manteniendo de este modo la homeostasis intestinal. La exposición continuada del epitelio colónico a altas concentraciones de ácidos biliares debido a la ingesta de dietas ricas en grasas se ha relacionado con el desarrollo de cáncer colorrectal. Los resultados se recogen en el artículo:

Juan Ignacio Barrasa, Nieves Olmo, Pablo Pérez-Ramos, [Angélica Santiago-Gómez](#), Emilio Lecona, Javier Turnay, M<sup>a</sup> Antonia Lizarbe. «*Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells*». *Apoptosis*, **16**: 1054-1067 (2011)

El tratamiento de las células BCS-TC2 con DCA y CDCA disminuye la viabilidad celular de una manera dependiente de concentración. A diferencia del efecto ejercido por butirato, esta muerte celular no es consecuencia de una diferenciación terminal de las células inducida por estos ácidos biliares como indica la valoración de fosfatasa alcalina. El tratamiento con DCA y CDCA promueve la liberación de las células de la monocapa, alcanzando el máximo tras 2 h de incubación. A tiempos más largos disminuye el número de células liberadas como consecuencia de la lisis celular provocada por daño en la membrana plasmática acorde con la valoración de la actividad de LDH liberada al medio de cultivo. Estos procesos dependen de la naturaleza de los ácidos biliares, siendo mayor el efecto ejercido por el CDCA que el de DCA. Ambos ácidos biliares desencadenan la apoptosis en las células BCS-TC2, detectándose una pérdida de la asimetría de membrana así como la fragmentación del DNA nucleosomal. A tiempos de incubación más largos, el porcentaje de células apoptóticas disminuye lo que se correlaciona con un aumento del porcentaje de células necróticas. Así, las células apoptóticas desprendidas sufren necrosis secundaria tras una larga exposición a estos ácidos biliares.

La apoptosis inducida por DCA y CDCA sigue la vía intrínseca mitocondrial, aunque de forma más pronunciada en el caso de este último, activando a la caspasa-9 y

ésta, a su vez, a la caspasa efectora 3, sin afectar a la caspasa-8. La activación de la caspasa-3 se ha verificado por la degradación de varias dianas de sus dianas nucleares como PARP, lámina B1, p21 y p53. Asimismo, los ácidos biliares inducen la exposición del dominio N-terminal de Bax, cambio conformacional que es esencial para que la proteína oligomerice, se integre en la membrana de la mitocondria y altere su permeabilidad. Esta activación de Bax está acompañada de una reducción de los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, efecto que no se observan en presencia del inhibidor genérico de caspasas Z-VAD-FMK y que, por consiguiente, indica que es dependiente de la activación de las caspasas. La activación inicial de las caspasas en las células tratadas con DCA y CDCA es desencadenada por un aumento de la producción de ROS por la activación, principalmente, de NAD(P)H oxidasas con una pequeña contribución de la PLA<sub>2</sub>, según indica el uso de inhibidores específicos de estas enzimas de membrana. El CDCA, y en menor medida el DCA, son capaces de incrementar la producción de ROS en las células BCS-TC2, lo que se correlaciona con una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, provocando la transición de permeabilidad mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas al citosol. En resumen, DCA y CDCA inducen apoptosis en las células BCS-TC2 mediante la vía mitocondrial: a) los ácidos biliares activan enzimas que generan estrés oxidativo, promoviendo la transición de permeabilidad mitocondrial, y liberando proteínas pro-apoptóticas, b) esto permite la activación de la caspasa-9, activando a su vez a la caspasa-3 que causa la degradación de Bcl-2, lo que facilita, la oligomerización de Bax, amplificando la apoptosis y, c) la pérdida de integridad mitocondrial provoca deficiencia en la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, disminuyen los niveles de ATP lo que promueve *in vitro* un cambio de apoptosis a necrosis en las células.

### Aportación personal

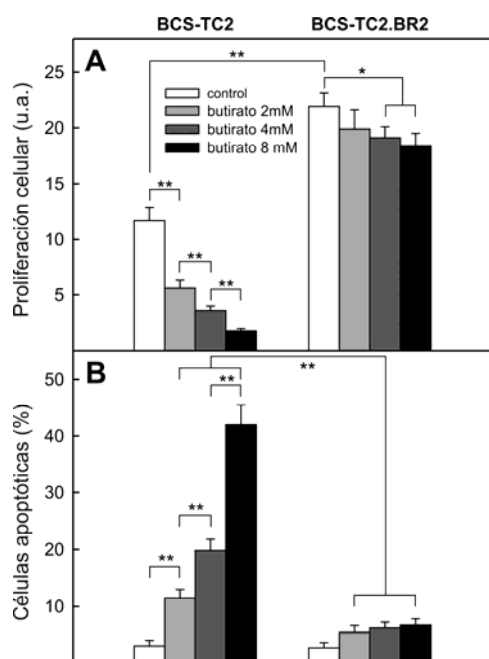
Se ha contribuido en el análisis de la viabilidad así como de la diferenciación celular valorando el contenido en ATP y la actividad de la fosfatasa alcalina, respectivamente, tras el tratamiento de las células BCS-TC2 con DCA y CDCA. Asimismo, se ha colaborado en los estudios de necrosis celular valorando la liberación de LDH a distintos tiempos de tratamiento con los ácidos biliares.

#### 4.2.5. Efectos del butirato en la señalización celular en proliferación y diferenciación y en apoptosis

El butirato ejerce efectos anticarcinogénicos sobre las células transformadas, inhibiendo la proliferación e induciendo diferenciación y apoptosis. Sin embargo, no están definidos los mecanismos de señalización intracelular responsables de estos efectos, muchos de ellos comunes a otros inhibidores de las HDAC. Por ello, se ha caracterizado el efecto de dichos inhibidores, particularizando en el butirato, en la activación de las rutas de señalización en las células parentales BCS-TC2 y en las BCS-TC2.BR2 resistentes a los efectos apoptóticos del butirato.

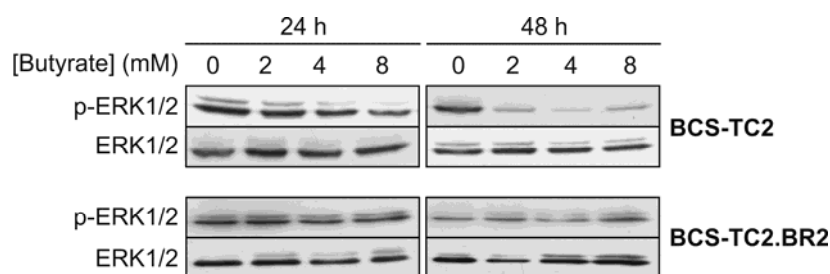
##### *Supervivencia y proliferación*

Paradójicamente el butirato regula la homeostasis intestinal promoviendo la proliferación de las células presentes en la parte basal de la cripta, mientras que induce parada de ciclo celular y apoptosis en células transformadas. En la Figura 22 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de butirato sobre la proliferación celular y los cambios en el número de células apoptóticas en los dos tipos celulares. De hecho, el tratamiento de las células con butirato durante 4 días reduce de forma drástica, y dependiente de concentración, la proliferación en las células BCS-TC2, siendo el efecto mucho más moderado en las células BCS-TC2.BR2 (Figura 22A). Ello se puede relacionar con una mayor inducción de apoptosis en las células parentales, siendo este efecto casi inapreciable en las células resistentes (Figura 22B).



**Figura 22. Efecto del butirato en la proliferación celular y apoptosis de células de adenocarcinoma de colon.** Las células se siembran a una densidad celular de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup> y, tras dos días, el medio se reemplaza por otro fresco que contiene butirato 2, 4 u 8 mM, manteniéndose las células en estos medios durante 4 días. (A) La proliferación celular se determina por el método del MTT y se utiliza como referencia (valor 1) la absorción debida al número de células inicial. Los valores son la media ( $\pm$  SD) de doce medidas diferentes procedentes de tres experimentos independientes. (B) El porcentaje de apoptosis se determina mediante microscopía confocal tras tinción con naranja de acridina y yoduro de propidio. (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ).

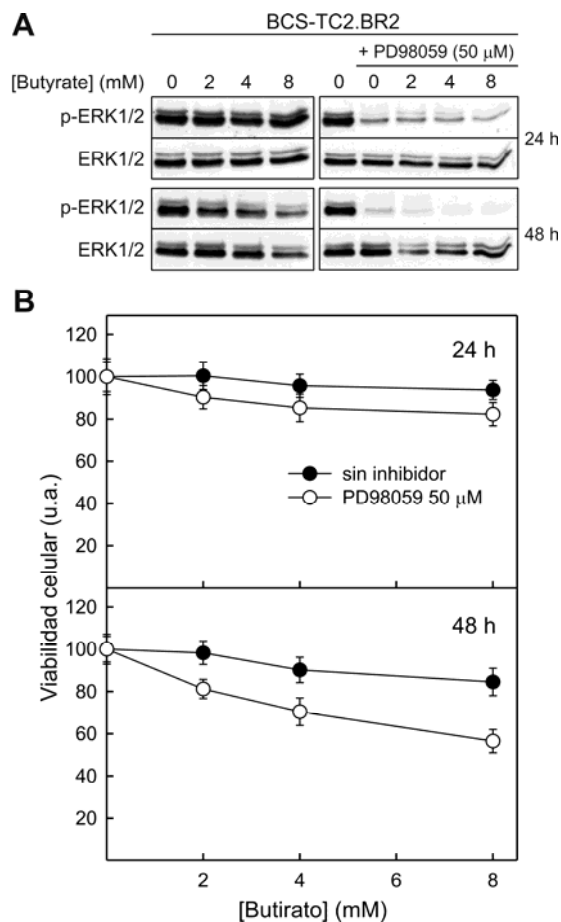
El efecto del butirato en la activación de ERK1/2, una de las de quinasas implicadas en la regulación del ciclo celular, proliferación y supervivencia se muestra en la Figura 23. En las células BCS-TC2, tras 24 h de tratamiento con butirato la forma fosforilada de ERK1/2 se reduce ligeramente a 4 mM de butirato y este efecto es superior a 8 mM. Sin embargo, a 48 h de tratamiento la reducción de la fosforilación de ERK1/2 es muy significativa a las tres las concentraciones de butirato utilizadas. Así, el tratamiento con butirato inhibe la fosforilación de ERK1/2 de forma dependiente de tiempo y concentración en las células BCS-TC2, lo que concuerda con la disminución de proliferación y el incremento en apoptosis observados. En las células BCS-TC2.BR2 el nivel basal de la forma fosforilada es inferior al de las células parentales y el butirato no modifica significativamente los niveles de fosforilación de ERK1/2. (Figura 23).



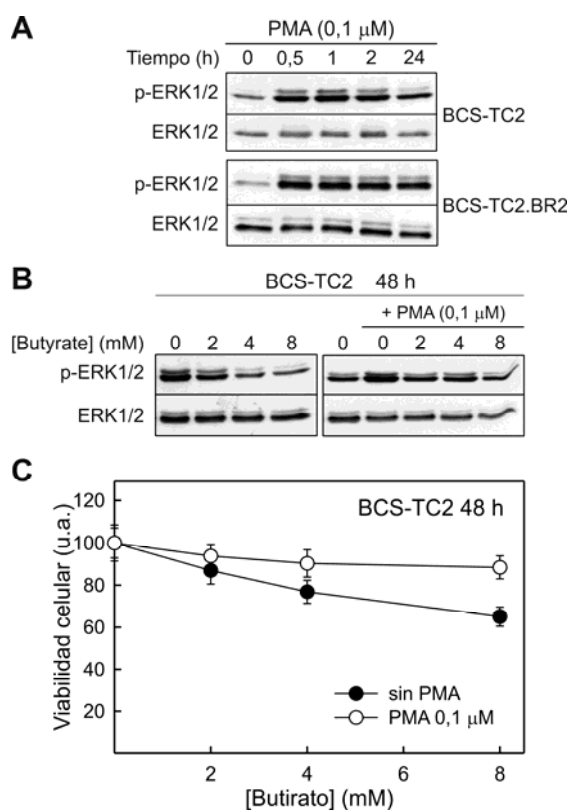
**Figura 23. Efecto del butirato sobre la ruta de señalización ERK1/2 en células de adenocarcinoma de colon.** Las células se tratan con distintas concentraciones de butirato durante 24 o 48 h. Transcurrido este tiempo, las células se lisan en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas, se separan por PAGE-SDS al 10% y se determina la expresión de las formas fosforilada (f-ERK1/2) y no fosforilada mediante *Western blot*.

Dado este comportamiento diferencial entre los dos tipos celulares respecto a la activación de ERK1/2, y para intentar comprender mejor el mecanismo de resistencia desarrollado por las células BCS-TC2.BR2, y la posible implicación de ERK1/2 en el mismo, se han preincubando las células resistentes con un inhibidor específico de ERK1/2 (PD98059). El tratamiento con el inhibidor induce una disminución de la fosforilación basal de ERK1/2. El butirato, en estas condiciones, induce una inhibición de la fosforilación de ERK dependiente de tiempo y concentración que no se observaba en ausencia de inhibidor (Figura 24A). Este tratamiento conlleva una mayor pérdida de viabilidad, apreciable sobre todo a 48 h (Figura 24B).

En un intento de recuperar la viabilidad de las células BCS-TC2 tras el tratamiento con butirato, se ha empleado PMA, un mitógeno que promueve la fosforilación de ERK1/2. Primero se ha determinado el efecto del PMA sobre los dos



**Figura 24. Inhibición de la activación de ERK1/2 en las células BCS-TC2.BR2.** Las células se tratan durante 2 h con el inhibidor PD98059 (50  $\mu$ M) y, después se elimina el inhibidor del medio y tratan con concentraciones crecientes de butirato durante 24 o 48 h. La activación de ERK1/2 se valora mediante *Western blot* (A), y la viabilidad mediante ensayo de MTT (B).

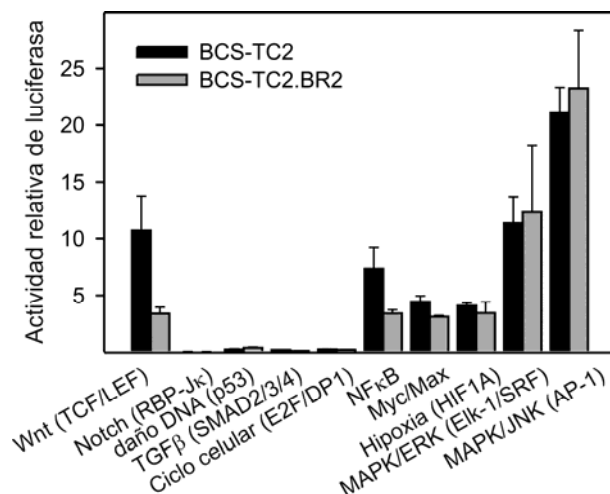


**Figura 25. Efecto del tratamiento con PMA sobre las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.** (A) Las células se tratan con PMA 0,1  $\mu$ M durante distinto tiempo, se recogen, se lisan en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas y se someten a *Western blot* para detectar ERK1/2 en sus formas fosforilada y total. (B) Pretratamiento con PMA.



tipos celulares y, como se observa en la Figura 25A, en ambos casos el PMA induce la activación de ERK1/2. En las células parentales tratadas con butirato, en presencia de PMA, se observa una menor disminución de la fosforilación de ERK1/2, se mantiene la activación a concentraciones superiores de butirato (Figura 25B). Además, un hecho interesante es que el PMA no sólo contrarresta la disminución de la activación de la quinasa inducida por butirato sino que, como se observa en la Figura 25C, la viabilidad celular se recupera parcialmente. Por lo tanto, si se recupera la viabilidad celular, la insensibilidad de las células BCS-TC2.BR2 a la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 inducida por butirato puede estar relacionada con su mecanismo de resistencia a la apoptosis, sin descartar que existan otros factores implicados en la resistencia.

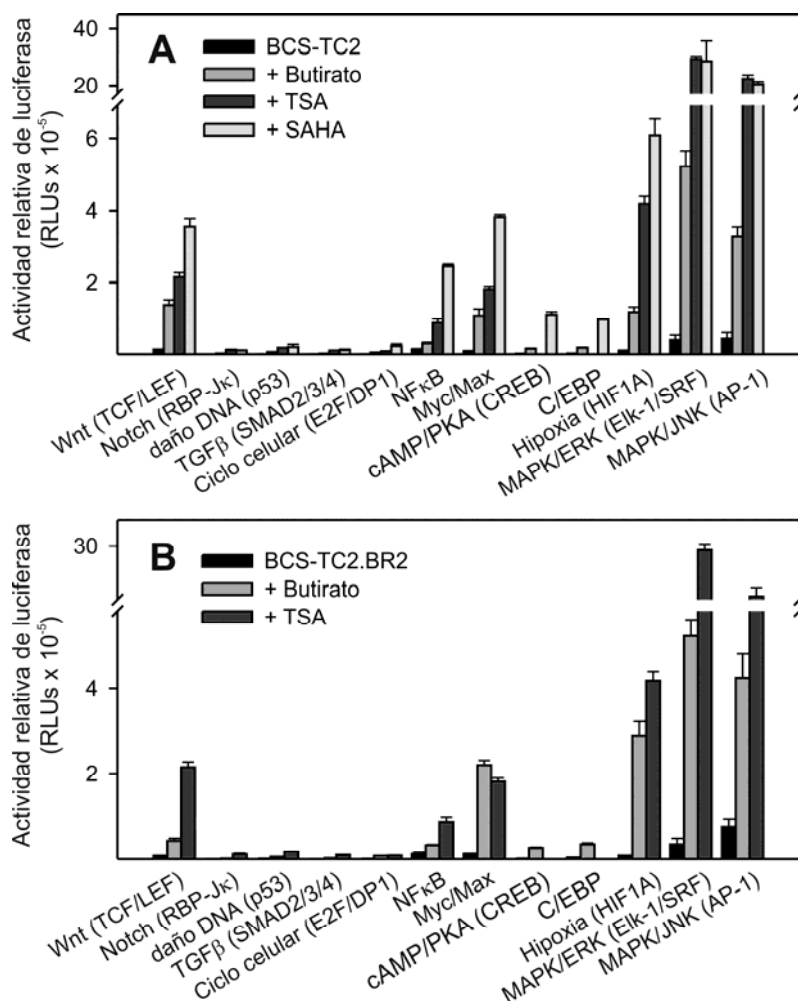
Con el fin de profundizar en los efectos de los inhibidores de las HDAC sobre la señalización celular se han realizado *arrays* de rutas de señalización entre las que se encuentra la ruta de señalización de ERK1/2. Este ensayo se basa en la activación de la expresión de la luciferasa, de tal forma que delante de este gen *reporter* hay un elemento de respuesta inducible por un determinado factor de transcripción correspondiente a una ruta de señalización concreta. Las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 se transfectan de forma reversa con las construcciones correspondientes y, tras el tratamiento deseado, se valora la actividad de luciferasa (Figura 26).



**Figura 26. Activación basal de distintas rutas de señalización en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.** Las células se resuspenden en medio de transfección y se siembran en una placa de 96 pocillos que contienen los plásmidos correspondientes. Tras 18 h, se añade medio completo y 24 h más tarde se mide la actividad luciferasa. Los datos obtenidos se normalizan frente a la actividad de luciferasa de *Renilla*.

A nivel basal, la señalización intracelular de ambos tipos celulares es muy parecida, observándose una activación similar de Myc/Max, ERK1/2, JNK y la señalización dependiente de hipoxia, mientras que no se detecta activación del resto de vías. Es de destacar que las vías de señalización Wnt y NFκB se encuentran más activadas en las células parentales. Además, la activación basal de JNK es mayor que la

de ERK, siendo ambas MAPK las principales vías de señalización activas tanto en las células parentales como en las resistentes. El tratamiento con los inhibidores de las HDAC durante 24 h induce cambios en la señalización celular. Así, en células BCS-TC2 el butirato induce la expresión de la luciferasa dependiente de Wnt, NF $\kappa$ B, Myc/Max, ERK1/2, JNK, hipoxia, c/EBP y PKA, respecto a las células en estado basal (Figura 27A).

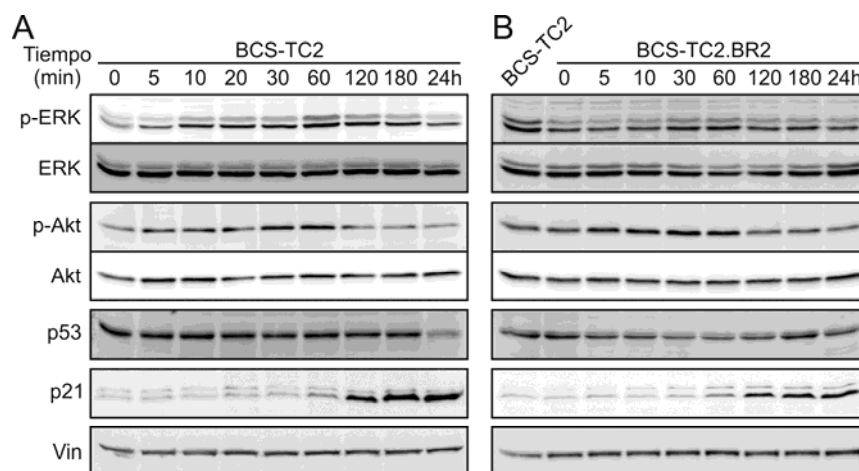


**Figura 27. Efecto de los inhibidores de las HDAC sobre la señalización de las células de adenocarcinoma de colon humano.** Se realiza el *array* de rutas de señalización, como en la Figura 26, en células BCS-TC2 (A) y BCS-TC2.BR2 (B). Una vez realizada la transfección, ambos tipos celulares se tratan durante 24 h con medio completo en presencia de butirato 4 mM, TSA 0,5  $\mu$ M o con SAHA 2,5  $\mu$ M (sólo en células parentales). Transcurrido el tiempo, se detecta la actividad de la luciferasa en un lector de placas de luminiscencia.

En conjunto, las mismas vías de señalización se inducen tras el tratamiento con butirato en las células resistentes, aunque existen diferencias con las células parentales, en la señalización dependiente de hipoxia y de PKA, que casi se duplican, y en la vía de Wnt que se reduce a la mitad (Figura 27B). Asimismo, con fines comparativos se

han tratado ambos tipos celulares con la TSA 0,5  $\mu$ M (Figura 27A y 27B), observándose tanto en las células parentales como en las resistentes un incremento de la actividad luciferasa superior al ejercido por el butirato, aunque el efecto es algo más moderado en las células resistentes. Además, en las células BCS-TC2 también se ha analizado el efecto de otro inhibidor de las HDAC, ácido hidroxámico SAHA. A una concentración de SAHA de 2,5  $\mu$ M se inducen las mismas vías pero el efecto es superior al ejercido por el butirato y la TSA (Figura 27A). Por lo tanto, estos resultados muestran que, a las concentraciones utilizadas, los inhibidores de las HDAC están implicados en la modulación de las varias vías de señalización.

La información obtenida de los *arrays*, con respecto a la señalización ERK1/2, puede parecer contradictoria al comparar los resultados con los obtenidos por *Western blot*. En este caso se realiza una medida puntual de la activación de esta quinasa a las 24 h del tratamiento con butirato, mientras que la información extraída del *array* es acumulativa, es decir, es el sumatorio de la activación transcripcional de la ruta durante las 24 h de tratamiento con el agente. Por lo tanto, se ha determinado el efecto del butirato en la señalización celular a tiempos cortos (Figura 28).

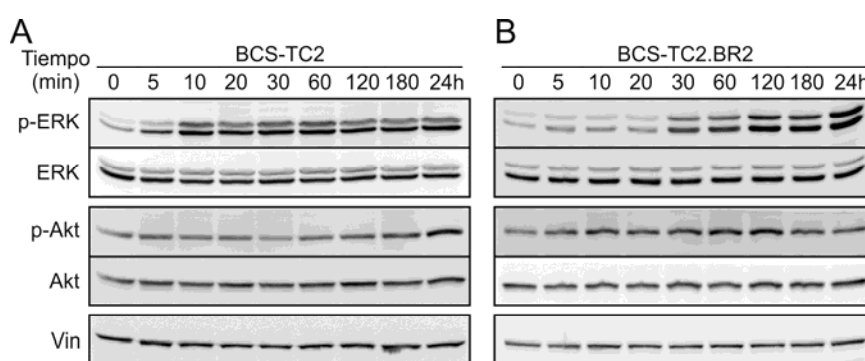


**Figura 28. Efecto del butirato (tiempos cortos de incubación) sobre rutas de señalización en células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.** Las células parentales (A) y la sublínea resistente (B) se incuban con butirato 4 mM durante los tiempos indicados. Una vez terminado el tratamiento, las células se recogen y se obtienen extractos celulares utilizando inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras se someten a PAGE-SDS al 10% (al 15% para detectar la proteína p21) seguido de *Western blot* para valorar la expresión de distintas proteínas. Como control de carga interno se utiliza la vinculina, proteína del citoesqueleto que no se modifica por este tratamiento.

En estas condiciones, en las células BCS-TC2 se observa un aumento progresivo de la fosforilación de ERK1/2 cuyo máximo se alcanza a los 60 min y, a partir de las 2 h comienza a decaer, lo que coincide con incremento de la expresión de p21, que inhibiría el ciclo celular. Al mismo tiempo, se observa un aumento de la fosforilación de Akt que sigue un patrón similar al de la fosforilación de ERK1/2. Además, el tratamiento con butirato induce la represión de la expresión de p53 de forma dependiente de tiempo (Figura 28A).

En cambio, las células BCS-TC2.BR2 sufren un incremento de la activación de ERK1/2 entre los 30 y los 60 min para descender posteriormente hasta el nivel basal, al igual que ocurre con Akt; en este caso los niveles de fosforilación se incrementan hasta los 60 min. Al contrario de lo que sucede en las células parentales, los niveles de p53 no disminuyen de forma tan acusada como en las células parentales. También en las células resistentes se detecta un aumento de la expresión de p21 a las 2 h de tratamiento (Figura 28B). No se observan modificaciones sobre la expresión total de las distintas quinasas debidas al tratamiento con butirato.

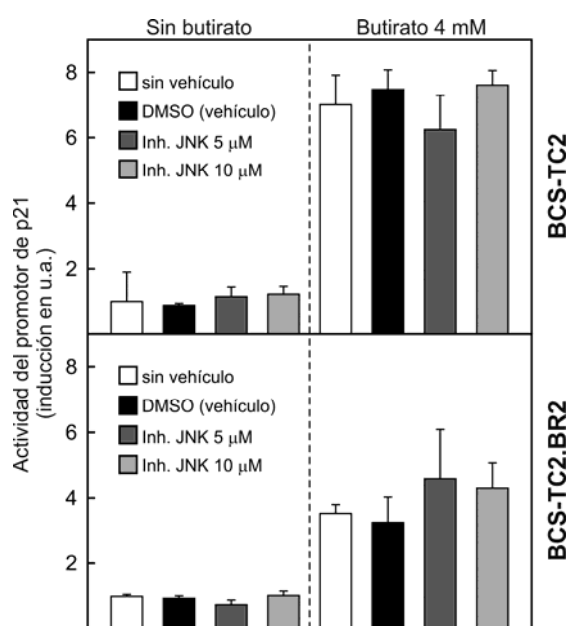
El efecto de la activación de ERK1/2 y Akt, a tiempos cortos, podría ser la forma que tiene la célula de intentar compensar los efectos apoptóticos inducidos por el butirato. Este tipo de respuesta en estas vías de señalización se ha observado también cuando las células se tratan con PMA (Figura 29), con la diferencia de que este mitógeno continua promoviendo la fosforilación de ERK1/2 y Akt tras 24 h de tratamiento en las células BCS-TC2.



**Figura 29. Efecto del PMA (tiempos cortos de incubación) sobre rutas de señalización en células de adenocarcinoma de colon.** Las células BCS-TC2 (A) y BCS-TC2.BR2 (B) se tratan con PMA 0,1  $\mu$ M durante los tiempos indicados, tras lo cual, se obtienen extractos celulares en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa, y las proteínas se separan por PAGE-SDS seguido de *Western blot*. Como control de carga interno se utiliza la vinculina.

En las células BCS-TC2.BR2, la fosforilación de ERK1/2 se incrementa a partir de los 60 min y la de Akt se incrementa ligeramente hasta los 120 min y, posteriormente, los niveles de fosfoAkt son similares a los basales.

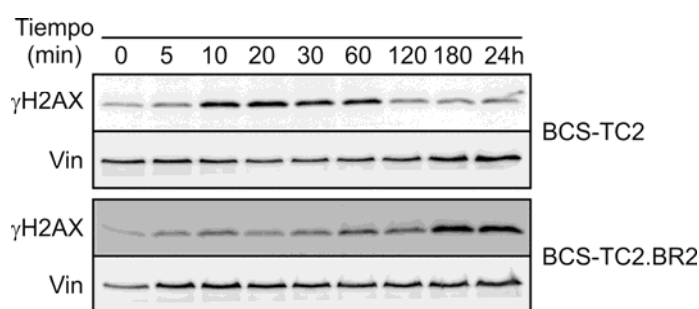
De acuerdo a los resultados del *array*, tanto a nivel basal como con el tratamiento con butirato se observa una activación de la vía de JNK. Se ha intentado valorar la activación de JNK mediante *Western blot*. El tratamiento con butirato, tanto a tiempos cortos como largos, no modifica el nivel total de JNK en las células y no se ha detectado la proteína fosforilada a pesar de haber utilizado dos anticuerpos fofoespecíficos. Por ello, se ha realizado una valoración indirecta de la activación de JNK mediante dos estrategias. Primero se ha intentado determinar la expresión del heterodímero AP-1 (c-fos/c-Jun), cuya expresión se induce y, además se fosforila, por la proteína JNK activada, pero no se obtuvo resultado alguno. Por otro lado, ya que uno de los efectos del butirato es inducir una parada del ciclo celular mediante la expresión de p21, se ha valorado si la señalización dependiente de JNK está implicada en este proceso. Para ello se han transfectado las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 con una construcción que contiene el promotor de p21 seguido del gen de la luciferasa. Posteriormente las células se preincuban durante 2 h en ausencia o presencia de un inhibidor específico de JNK (SP600125). Transcurrido ese tiempo se retira el inhibidor, se añade medio completo (control) o el suplementado con butirato 4 mM y 24 h después se valora la actividad luciferasa (Figura30).



**Figura 30. Efecto de la inhibición de JNK sobre la activación transcripcional del promotor de p21.** Las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 se siembran y se transfectan con 1  $\mu$ g de una construcción que contiene el promotor de p21 controlando la expresión del gen de luciferasa de luciérnaga (WWP-Luc). Tras la transfección, las células se incuban durante 2 h en presencia o ausencia del inhibidor de JNK (SP600125) a las concentraciones indicadas. Transcurrido el tiempo, se eliminan los inhibidores del medio y se añade medio completo con o sin butirato 4 mM. Tras 24 h se mide la activación transcripcional del promotor mediante la detección de la actividad luciferasa en un luminómetro.

La activación transcripcional del promotor de p21 por butirato es mayor en las células parentales que en las resistentes. Sin embargo, tras el tratamiento con butirato, el inhibidor de JNK no es capaz de suprimir dicha activación, por lo que no queda constatada la implicación de JNK en la proliferación células de estas células.

Los inhibidores de las HDAC podrían causar daño en el DNA por lo que se ha valorado la existencia de roturas de la doble hebra del DNA mediante el sensor  $\gamma$ H2AX en células tratadas con butirato (Figura 31). En las células BCS-TC2 se observa un aumento en la fosforilación de esta histona modificada tras 10 minutos de tratamiento y decae a partir de los 60 min. En cambio, en las células BCS-TC2.BR2 la rotura del DNA se induce a partir de las 3 h de incubación. Al igual que se ha observado en otras respuestas de las células, la de las células BCS-TC2.BR2 se detecta posteriormente, hecho que podría estar relacionado con la resistencia.

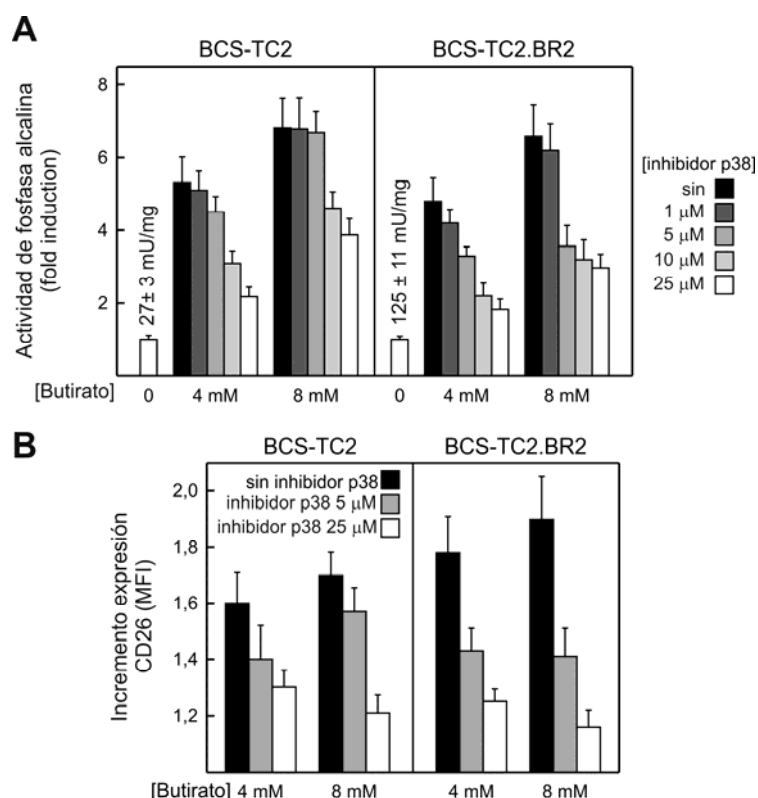


**Figura 31. Daño en el DNA inducido por el butirato en células de adenocarcinoma de colon.** Las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 se tratan con butirato 4 mM a los tiempos indicados, se lisan en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas y se determina la expresión de la histona modificada  $\gamma$ HA2X tras someter a las muestras a PAGE-SDS al 15% y posterior *Western blot*. Como control de carga interno se emplea la vinculina.

### Diferenciación

Estudios previos en el grupo utilizando las células sensibles y las resistentes a butirato han demostrado que el butirato induce diferenciación celular de una manera dependiente de concentración (Navarro y col., 1997; López de Silanes y col., 2004). Por ejemplo se ha descrito un incremento de aproximadamente 10 veces en la actividad de la fosfatasa alcalina de las células BCS-TC2 tratadas con 8 mM butirato durante 4 días. Cabe señalar que en las células resistentes a la apoptosis inducida por este agente son sensibles a otros efectos, como la inducción de diferenciación. Asimismo, se ha demostrado que en los dos tipos de células, el tratamiento con butirato incrementa la

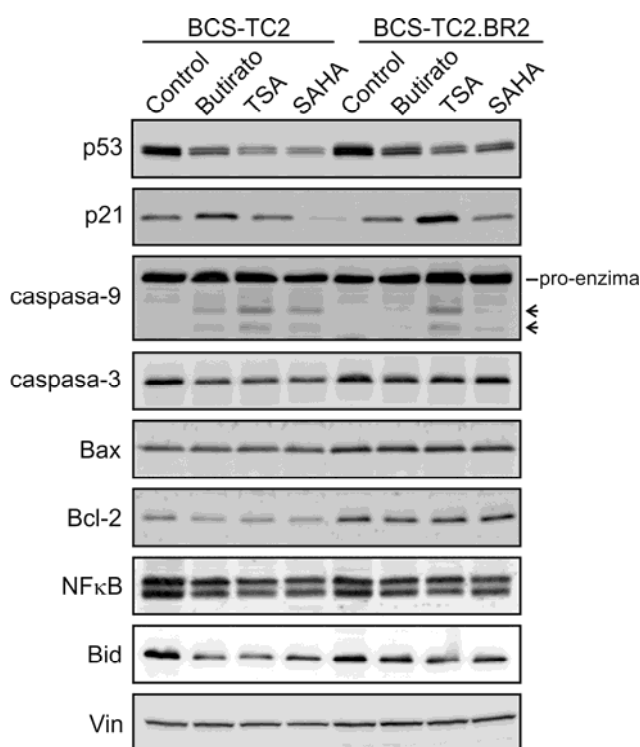
fosforilación de p38 MAPK, al mismo tiempo que induce la activación transcripcional del gen *ANXA1*. La activación de p38 MAPK se ha relacionado con la inducción de diferenciación de forma indirecta a través de la anexina A1, marcador de diferenciación en las células de colon (Lecona y col., 2008). Por ello, se ha planteado valorar la expresión de marcadores de diferenciación en presencia de un inhibidor específico de p38 MAPK (SB203580) en ambos tipos celulares. Como se observa en la Figura 32, el butirato induce un incremento de la actividad de fosfatasa alcalina dependiente de concentración como se había observado previamente, siendo el grado de diferenciación mayor en las BCS-TC2.BR2. La presencia del inhibidor (a concentraciones entre 1 y 25  $\mu$ M) reduce dicha actividad de forma dependiente de concentración (Figura 32A). Un resultado similar se obtiene cuando se valora la expresión de dipeptidil peptidasa IV (CD26) por citometría de flujo (Figura 32B). Estos datos confirman que el butirato induce diferenciación celular en células de colon a través de la activación de p38 MAPK.



**Figura 32. Implicación de p38 MAPK en la diferenciación inducida por butirato en células de adenocarcinoma de colon.** Las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 se incuban con butirato 4 mM durante 4 días en presencia o ausencia del inhibidor de p38 MAPK SB203580 a las concentraciones indicadas. Como control se utiliza el vehículo del inhibidor, DMSO. Tras la incubación, se valora (A) la actividad de la fosfatasa alcalina empleando p-nitrofenilfosfato como sustrato, y (B) la expresión de la dipeptidilpeptidasa IV (CD26) por citometría de flujo.

## Apoptosis

Para establecer el mecanismo por el que el butirato, y otros inhibidores de las HDAC, inducen apoptosis se pueden determinar las variaciones en diferentes proteínas implicadas en apoptosis. Ello también podría apuntar diferencias en el proceso que permiten a las células adquirir resistencia a la apoptosis. La expresión de distintas proteínas implicadas en dicho proceso en los dos tipos de células tras el tratamiento con inhibidores de las HDAC durante 24 horas, se recoge en la Figura 33. El tratamiento con butirato 4mM, TSA 0,5  $\mu$ M o SAHA 2,5  $\mu$ M induce una disminución de la expresión de p53, siendo más acusado este efecto en el caso de las células parentales. Sin embargo, se observa un incremento de la expresión de p21 en ambas líneas celulares, hecho debe ser independiente de p53. Por otro lado, se observa una activación de la caspasa-9, que prácticamente no se detecta en las células BCS-TC2.BR2 tratadas con butirato, y una ligera reducción de los niveles de caspasa-3 en las células BCS-TC2 que puede corresponder a su activación proteolítica. No se observan diferencias en los niveles de Bax, mientras que los de Bcl-2 disminuyen ligeramente en las células parentales; las células resistentes presentan un nivel basal de Bcl-2 superior al de las parentales. En éstas últimas también se observa una ligera disminución de NF $\kappa$ B. En cuanto a la proteína Bid, los inhibidores de las HDAC disminuyen su nivel de forma acusada en las células parentales.



**Figura 33. Efecto de los inhibidores de las HDAC sobre proteínas apoptóticas en células sensibles y resistentes a los efectos apoptóticos inducidos por el butirato.** Las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 se tratan con butirato 4 mM, TSA 0,5  $\mu$ M, SAHA 2,5  $\mu$ M o con su vehículo (DMSO) durante 24 h. Tras ello, se obtienen los extractos celulares totales y se valora la expresión de distintas proteínas implicadas en la apoptosis mediante *Western blot*.



## 5. *Discusión*



## **5.1. ESTRUCTURA DEL ECTODOMINIO DE LA PROTEÍNA 4F2hc**

La proteína 4F2hc es una glicoproteína de membrana de tipo II, que se caracteriza por presentar un dominio C-terminal voluminoso en el espacio extracelular. Este dominio de la proteína puede sufrir modificaciones postraduccionales como glicosilación y/o fosforilación que pueden regular su interacción con otras proteínas (Deves y Boyd, 2000; Yan y col., 2007; Nguyen y col., 2008). Además cabe destacar que la estructura del ectodominio presenta un alto grado de homología con la familia 13 de las glicosilhidrolasas, conocidas comúnmente como  $\alpha$ -amilasas (Wells y Hediger, 1992). Sin embargo, la proteína 4F2hc carece de los residuos catalíticos y, por consiguiente, de la actividad enzimática (Fort y col., 2007).

En la determinación de la estructura tridimensional del ectodominio de 4F2hc, por cristalografía de rayos X se encontró que uno de los cristales era un dímero con un ión  $Zn^{2+}$  en la interfaz entre las dos subunidades (incluso en ausencia de la Cys<sup>109</sup> implicada en la unión covalente con otras proteínas). Además, también se ha descrito la existencia de dímeros de 4F2hc en células transfectadas, aunque en este caso por la formación de un puente disulfuro entre dos moléculas vecinas a través de las Cys<sup>109</sup> (Fort y col., 2007). Por todo ello, se ha planteado analizar si el ectodominio de 4F2hc es capaz de oligomerizar en disolución debido a interacciones laterales entre los monómeros y, además, analizar la influencia de cationes divalentes en esta asociación. Sin embargo, los estudios de entrecruzamiento químico en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  así como el análisis del equilibrio de sedimentación, han demostrado que 4F2hc-ED permanece en forma monomérica en disolución. Una posibilidad es que la fuerza que conduce a la homodimerización sean interacciones electrostáticas más que el efecto hidrofóbico, aunque la disminución de la fuerza iónica no provoca la formación del dímero. Por lo tanto, la inducción de la homodimerización puede ser facilitada por otros factores como interacciones entre los dominios transmembrana (estabilizado por el puente disulfuro entre las Cys<sup>109</sup>) o por la disposición de los monómeros sobre la membrana plasmática que está forzada por la inserción de la región hidrofóbica transmembrana en la misma (eliminada en el ectodominio recombinante).

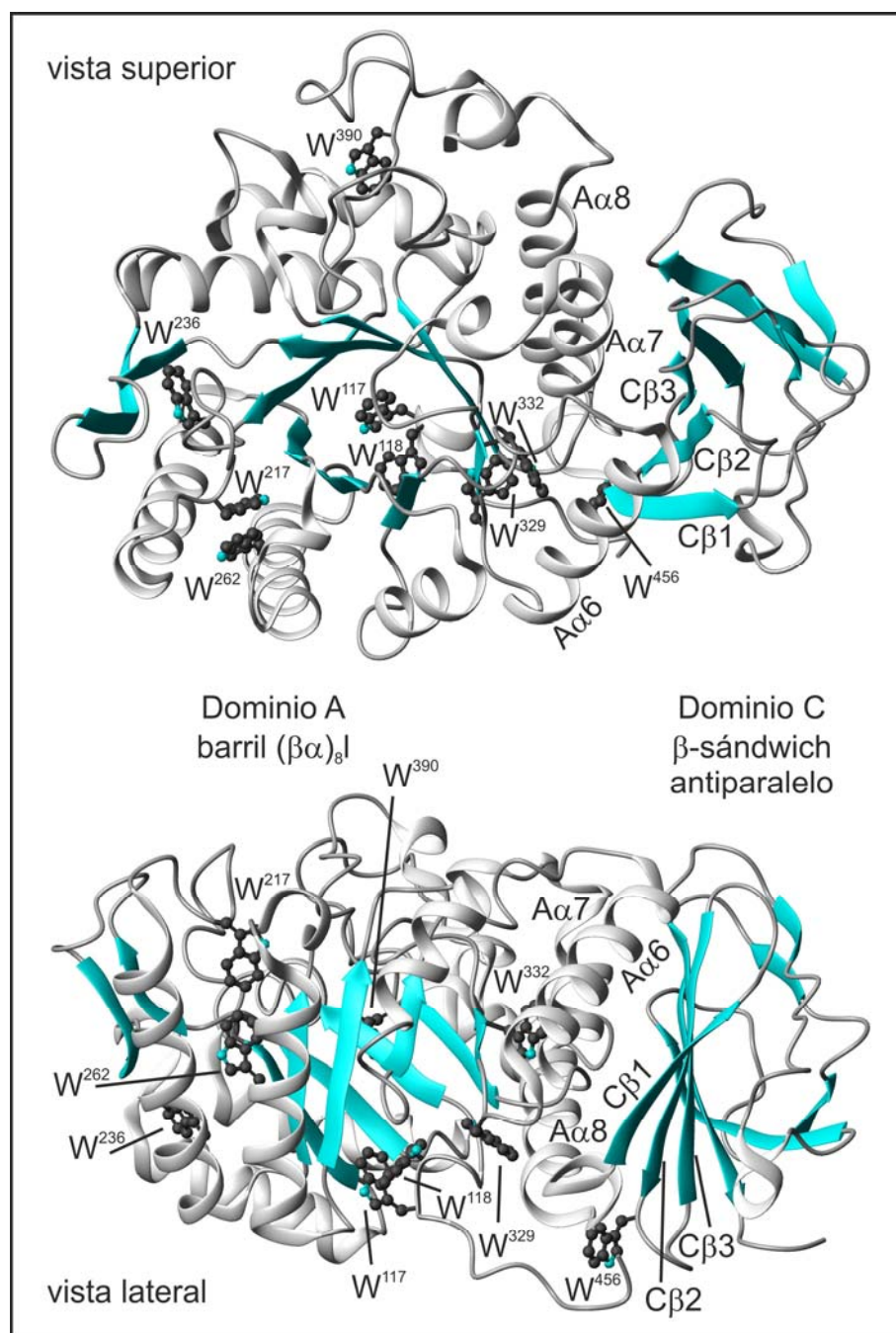
Los parámetros para el ectodominio no glicosilado en disolución (coeficiente de sedimentación, radio de fricción y un radio hidrodinámico) son similares a los

predichos mediante el programa HYDROPRO, lo que se corresponde con un elipsoide oblato o prolato con radios a/b de 3,20 o 3,07, respectivamente.

Los estudios de dicroísmo circular en el UV-lejano indican que la estructura secundaria del ectodominio recombinante en disolución se asemeja en su totalidad a la determinada mediante difracción de rayos X (Turnay y col., 2011). La proteína 4F2hc-ED mantiene en disolución sus dos principales dominios, A y C, como ocurre para la organización multidominio de las  $\alpha$ -amilasas (Gabrisko y Janecek, 2009). Tanto el barril TIM como el sándwich  $\beta$  son estructuras compactas y muy estables que dan lugar a una elevada estabilidad térmica, como se refleja en la temperatura de transición observada por dicroísmo circular y DSC. Aunque la desnaturalización térmica, por encima de 65 °C conduce a una agregación irreversible de la proteína, ésta se mantiene en disolución. Además, en estas condiciones muestra aún mayor elipticidad molar negativa, observándose un mínimo a 215 nm característico de las estructuras  $\beta$ . Probablemente la desnaturalización térmica conduce a una reorganización de la estructura secundaria perdiéndose regiones en  $\alpha$ -hélice (presentes en casi exclusivamente en el barril TIM) y exponiéndose tanto el barril  $\beta$  hidrofóbico como la región altamente hidrofóbica de contacto interdominios. De esta forma, la exposición de regiones hidrofóbicas promueve la autoasociación de las moléculas y la formación de nuevos puentes de hidrógeno dando lugar a complejos desordenados en estructuras  $\beta$ , como indica el incremento del espectro de dicroísmo circular a 80 °C. Además la estructura secundaria de la proteína plegada no se altera significativamente en presencia de cationes divalentes.

El desplegamiento de la proteína atendiendo a los cambios en la estructura secundaria (dicroísmo circular) y terciaria (entorno de los residuos de Trp) se ha analizado en el equilibrio a concentraciones crecientes de urea. Los 9 residuos de Trp se encuentran en el núcleo hidrofóbico de la proteína. De hecho, tanto los espectros de dicroísmo circular en el UV-próximo (2 mínimos alrededor de 280 nm) como el espectro de emisión de fluorescencia de los residuos de Trp (máximo a 323 nm y un hombro a 335 nm) sugieren la existencia de dos poblaciones de Trp. La mayoritaria se encuentra en un ambiente altamente hidrofóbico y la minoritaria exhibe un grado de exposición mayor. La constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}=2,6 \text{ M}^{-1}$ ) calculada por apagamiento con acrilamida indica que los residuos de Trp se encuentran en el núcleo

hidrofóbico de la proteína, lo que concuerda con la localización de estos residuos en la estructura tridimensional (Fort y col., 2007) (Figura 34).



**Figura 34. Posición de los residuos de triptófano en el ectodominio de 4F2hc.** Estructura tridimensional del ectodominio a partir del cristal monoclinico (PDB ID: 2DH2). Se muestran las cadenas laterales de los 9 residuos de triptófano y dos perspectivas rotadas 90° para facilitar la localización de los mismos. Se indica en cada caso la posición de los dominios A y C.

La desnaturalización inducida por urea provoca la exposición de los residuos de Trp al disolvente polar, observándose en el espectro un desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión y una disminución del valor a 323 nm, como consecuencia del apagamiento causado por el disolvente. Considerando la disminución de la intensidad de fluorescencia, el desplegamiento de esta proteína recombinante se ajusta a un modelo que contiene dos especies intermedias. Conforme al valor  $Z$  de los intermediarios, 6 residuos de Trp estarían expuestos y 3 permanecerían enterrados en  $I_1$ , y sólo uno estaría parcialmente enterrado en  $I_2$ . Este modelo de 4 estados está de acuerdo con los cambios observados en la estructura secundaria de la proteína por dicroísmo circular en el UV-lejano. Sin embargo, la transición de la conformación nativa  $N$  a  $I_1$  causa cambios significativos en el ambiente de los residuos de Trp (63% de desplegamiento), mientras que la estructura secundaria sólo se modifica un 18%. Este pequeño cambio afecta principalmente al contenido en  $\alpha$ -hélice pasando de un 30% a un 25%. Por lo tanto, este primer paso no produce una gran reorganización de la estructura secundaria, donde los dos dominios estructurales no se afectan, de forma similar a lo descrito para la desnaturalización del barril TIM en el estado intermedio  $I_1$  de la triptófano sintasa (Gualfetti y col., 1999; Vadrevu y col., 2008). En esta transición los parámetros termodinámicos indican un aumento de la superficie expuesta al disolvente, que debe afectar a los bucles de conexión de 4F2hc-ED. De hecho, 6 residuos de Trp se encuentran en estas regiones, mientras que los más internos ( $W^{236, 262, 332}$ ), localizados en el interior del barril TIM, no se verían afectados. Por lo tanto, el estado intermedio  $I_1$  podría representar una estructura de glóbulo fundido que mantiene la estructura secundaria de conjunto pero carece del fuerte empaquetamiento de las cadenas laterales (Kuwajima, 1989; Ptitsyn, 1995), como ocurre en otras proteínas que contienen barriles TIM como la subunidad  $\alpha$  de la triptófano sintasa (Gualfetti y col., 1999; Vadrevu y col., 2008), la N-(fosforibolsil) antranilato isomerasa (Jasanoff y col., 1994) y la indol-3-glicerolfosfato sintasa (Andreotti y col., 1997; Sanchez del Pino y Fersht, 1997). El segundo estado intermedio se caracteriza por presentar casi todos los residuos de Trp expuestos y haber perdido el 90% de la estructura secundaria, principalmente hélices  $\alpha$  (elipticidad molar por residuo a 222 nm). Este intermediario muestra una reorganización de la estructura secundaria, con casi una total desnaturalización de las hélices anfipáticas  $\alpha$  del barril, probablemente manteniendo las hélices hidrofóbicas ( $A\alpha 6$  y  $A\alpha 8$ ) localizadas en la interfaz interdominios (Fort y

col., 2007). Además podría conservar estructuras  $\beta$  del barril, como ocurre con otras proteínas como la triptófano sintasa o la anhidrasa carbónica, entre otras (Svensson y col., 1995; Gualfetti y col., 1999). Los parámetros termodinámicos indican que durante la transición  $I_2$  a la estructura completamente desplegada las cadenas laterales no polares de las cadenas  $\beta$  se asocian formando grupos hidrofóbicos, dando lugar a una proteína desnaturalizada muy estable. No está claro si este segundo intermediario sólo aparece durante la desnaturalización dando lugar a una proteína mal plegada pero con una estructura secundaria organizada. No puede detectarse que  $I_2$  sea una estructura relativamente estable de una incorrecta vía de plegamiento (*Off-pathway*), como se ha descrito para otras proteínas con barriles TIM (Forsyth y col., 2007; Vadrevu y col., 2008). Sin embargo, este tipo de intermediarios de rutas erróneas suelen presentar un elevado grado de estructura secundaria (aunque incorrecta), mientras que en este caso,  $I_2$  presenta sólo una estructura secundaria mínima formada por las interacciones hidrofóbicas entre cadenas laterales de algunas cadenas  $\beta$ . Durante el plegamiento esta especie intermedia presenta muy poca estructura secundaria formada por interacciones hidrofóbicas entre las láminas  $\beta$ .

En este estudio se propone un mecanismo de plegamiento/desnaturalización para el 4F2hc-ED, que no ocurre de forma secuencial e independiente, sino en el que parecen estar implicados dos estados intermedios. Uno es una estructura parecida a un glóbulo fundido y, el otro, una especie intermediaria casi desplegada con cadenas  $\beta$  estabilizadas mediante interacciones hidrofóbicas. Comparando estos datos con los obtenidos con otras proteínas con los mismo motivos estructurales, se sugiere que el plegamiento se inicia por la formación de agrupamientos hidrofóbicos a partir de las cadenas laterales dentro de las primeras cadenas  $\beta$  sintetizadas que corresponden al dominio A. Así, este núcleo sin estructura evoluciona a la formación de una estructura tipo glóbulo fundido con casi todos los elementos de estructura secundaria y terciaria de la forma nativa. En este último paso es en el que se expelen las moléculas de agua del núcleo interno dando lugar al correcto plegamiento del ectodominio.

## **5.2. PAPEL DE 4F2hc EN TUMORIGÉNESIS**

Desde su descubrimiento, como parte de un antígeno de superficie que conduce a la activación de linfocitos T (Haynes y col., 1981), se ha demostrado que 4F2hc está implicada en múltiples funciones. Esta glicoproteína de membrana se une

covalentemente a una de las varias cadenas ligeras descritas, permitiéndoles que alcancen la membrana plasmática y, una vez allí, posibilita el transporte de aminoácidos, cuyo flujo regula la ruta de señalización mTOR (Nakamura y col., 1999; Chillaron y col., 2001; Nicklin y col., 2009). La asociación de 4F2hc con la cadena  $\beta 1$  de integrinas media eventos de señalización dependientes de integrina, como supervivencia, proliferación, migración e incluso transformación (Fenczik y col., 1997; Hara y col., 1999; Feral y col., 2005).

En muchos tipos de cáncer se han observado irregularidades de la función de las integrinas. 4F2hc puede promover la proliferación celular durante la transformación maligna dado que su interacción con las integrinas  $\beta 1$  le permite modular la señalización dependiente de integrina promoviendo supervivencia y proliferación (Rintoul y col., 2002; Henderson y col., 2004). Se ha descrito que la región de 4F2hc que se asocia con las integrinas  $\beta 1$  es crítica para mantener el potencial tumorigénico de células madre embrionarias (Feral y col., 2005). Con el fin de profundizar en el papel que desempeña 4F2hc durante la tumorigénesis se ha silenciado de forma estable la expresión de esta proteína mediante un miRNA artificial en las células HeLa (alcanzando un 80% de silenciamiento). La represión de la proteína afecta al crecimiento tumoral *in vivo* en ratones atímicos de las células observándose un retraso en la aparición de los tumores. Ello tiene como consecuencia una reducción del peso del tumor, al igual que ocurre en los ensayos de tumorigenicidad en las células de adenocarcinoma de colon que posteriormente se comentarán. Del mismo modo, este comportamiento ha sido descrito por Feral y colaboradores tras eliminar el gen de 4F2hc en células madre embrionarias, recuperándose la formación de teratocarcinomas en ratones cuando se reexpresa la proteína o un mutante que interacciona sólo con integrinas (Feral y col., 2005). Por lo tanto, la expresión de 4F2hc parece ser crucial para la supervivencia y proliferación de las células durante la fase de latencia. Además, el grado de silenciamiento de 4F2hc disminuye muy significativamente (del 80 al 20-30%). Así que posiblemente una pequeña subpoblación de células no silenciadas completamente, capaces de proliferar, podrían dar lugar a un tumor enriquecido en estas células, mientras que las células silenciadas morirían al ser incapaces de proliferar en ese ambiente inhóspito. De esta forma se explicaría el retraso en la aparición del tumor en los ratones así como la recuperación de la expresión de la proteína en las células silenciadas tras los subcultivos. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho descrito en la literatura de que las células que no expresan 4F2hc muestran una



proliferación ineficiente. A modo de ejemplo, la delección de 4F2hc en células musculares lisas vasculares reduce la hiperplasia de la capa íntima tras sufrir un daño arterial, suprimiéndose la proliferación e induciéndose apoptosis (Fogelstrand y col., 2009). En linfocitos, su delección causa la supresión de la proliferación clonal en células B y T (Cantor y col., 2009; Cantor y col., 2011). También los tumores procedentes de células madre embrionarias 4F2hc<sup>-/-</sup> exhiben una reducción significativa de la proliferación celular como indica la valoración del antígeno nuclear de proliferación celular (Feral y col., 2005).

Dada la importancia de 4F2hc en las etapas iniciales de la tumorigénesis, se han considerado los procesos de adhesión y extensión sobre los componentes de la ECM. Estos procesos son clave para la supervivencia de células adherentes y previos a su proliferación. El silenciamiento de 4F2hc no afecta de forma significativa a estos eventos celulares dependientes de integrina en presencia de componentes de la ECM. Por el contrario, la respuesta proliferativa de las células silenciadas se reduce en respuesta a mitógenos como el suero o el PMA, mientras que no se altera ante componentes de la ECM. De este modo se confirma la existencia de defectos en la proliferación de las células silenciadas, lo que podría relacionarse con los defectos encontrados en el crecimiento tumoral.

Además de asociarse en la membrana con las integrinas  $\beta 1$ , concretamente en microdominios de alta densidad, 4F2hc forma el eje central de un complejo multimolecular en la membrana junto a CD147/EMMPRIN en células HT1080 y MCF-7 (Xu y Hemler, 2005). La colocalización de las 3 proteínas en la membrana de las células HeLa sugiere la presencia de las integrinas  $\beta 1$  como parte de ese complejo multimolecular. De hecho, CD147/EMMPRIN se identificó como una proteína que se asocia a integrinas (Berditchevski y col., 1997). Asimismo, distintos estudios muestran resultados contradictorios sobre cómo afecta a la expresión de proteínas relacionadas el silenciamiento de 4F2hc empleando estrategias de RNA de interferencia. En células HEK293 así como en células de cáncer de ovario, la represión de 4F2hc provoca la disminución de la expresión de CD147/EMMPRIN (Xu y Hemler, 2005; Yang y col., 2007), mientras que en las células promonocíticas THP-1 no se altera la expresión de CD147/EMMPRIN (Melchior y col., 2008). En nuestro caso el silenciamiento de 4F2hc en células HeLa no afecta significativamente a la expresión de las integrinas  $\beta 1$  ni de CD147/EMMPRIN, ni siquiera altera la expresión de su ligando fisiológico, la

galectina-3. Sin embargo, se observa una disminución de la expresión total de la MMP-2 que es una de las proteínas inducidas por CD147/EMMPRIN.

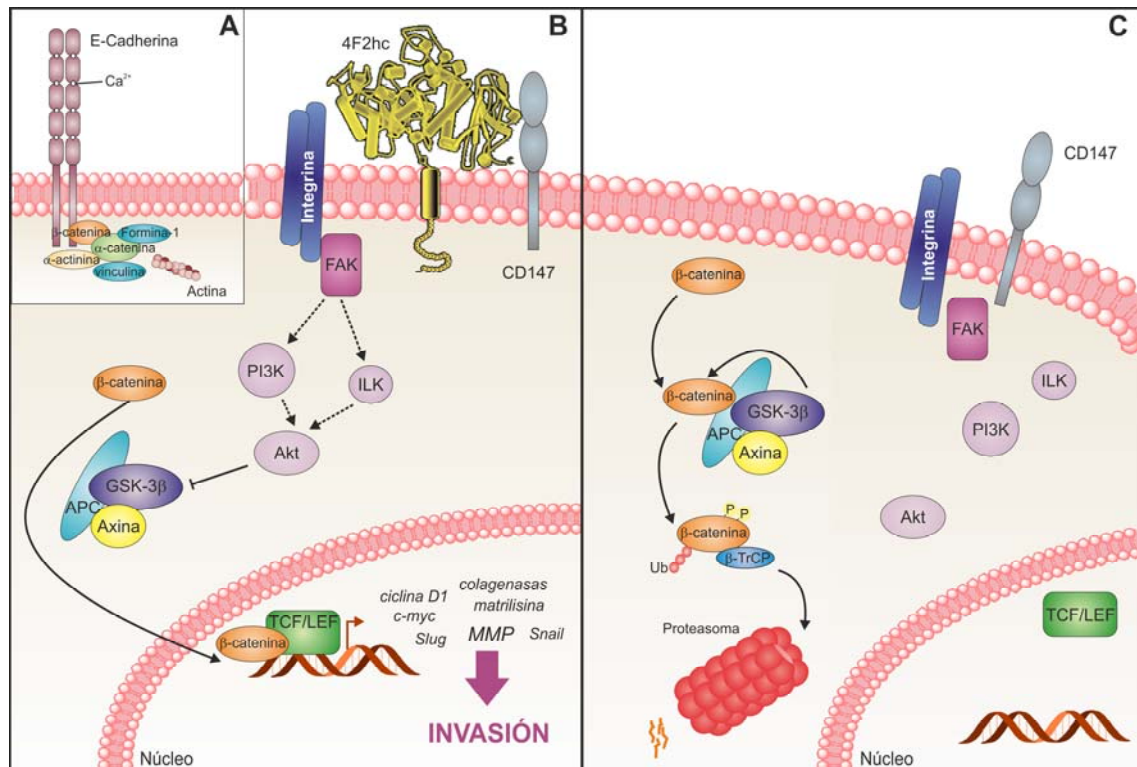
CD147/EMMPRIN estimula en fibroblastos y células tumorales la producción de las MMP y factores angiogénicos (Toole, 2003; Tang y col., 2005). Entre todas las MMP, las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 son importantes en la invasión tumoral y la metástasis, degradando el colágeno de tipo IV, componente de la lámina basal, (Stetler-Stevenson y col., 1996). Además las MMP se utilizan como marcadores pronóstico de la recurrencia de la enfermedad (Vihinen y Kahari, 2002). Las células HeLa expresan principalmente la MMP-2, y su sobreexpresión se ha relacionado con las etapas iniciales de la carcinogénesis ovárica (Kenny y col., 2008; Intasai y col., 2009; Roomi y col., 2010). La actividad de la MMP-9 es casi indetectable en estas células (Roomi y col., 2010). Teniendo en cuenta que estas proteasas ejercen su función extracelularmente, se ha valorado su expresión y actividad en medios condicionados. Hemos observado que el silenciamiento de 4F2hc en células HeLa reduce la expresión de la MMP-2 en el medio extracelular, lo que tiene como consecuencia una disminución de su actividad (alrededor de 4 veces). Asociada a la disminución de la expresión y de la actividad de la MMP-2, en las células silenciadas se observa una acumulación de la forma intacta de la galectina-3 en el espacio extracelular. Casualmente el ligando endógeno de 4F2hc, la galectina-3 contiene una región N-terminal que es susceptible de sufrir rotura por gelatinasas, dando lugar a una proteína truncada de 22 kDa. Esta forma presenta una reducida autoasociación y una alta afinidad por glicoconjugados, mientras que la forma intacta de la galectina-3 es capaz de oligomerizar y entrecruzar glicanos de la superficie celular iniciando eventos de señalización (Ochieng y col., 1998; Yang y col., 2008).

El entrecruzamiento de 4F2hc en las células HeLa con un anticuerpo específico que estimula la adhesión celular a componentes de la ECM provoca una disminución de la actividad de la MMP-2 (Fenczik y col., 1997). Este comportamiento puede deberse a que el anticuerpo utilizado promueve el anclaje de la célula a la ECM y, por lo tanto, no se producirá la invasión de los tejidos adyacentes.

Por otro lado, se ha descrito que la inducción de la expresión de las MMP por CD147/EMMPRIN es dependiente de la señalización de las MAPK (Jia y col., 2009). En cáncer de mama, la expresión de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 está regulada por ERK1/2 (Li y col., 2007), y en carcinoma ovárico metastásico la activación de ERK1/2, p38 y JNK ocurre paralela a un incremento en la producción de la MMP-2 (Davidson y

col., 2003). También se ha propuesto que la integrina  $\alpha 5 \beta 1$  controla la invasión de células de carcinoma de mama bien por reclutamiento directo de la MMP-2 en la superficie o bien a través de rutas de señalización como las de PI3K, Akt, ERK1/2 y JNK (Morozevich y col., 2009). En las células HeLa en las que se ha silenciado 4F2hc hay una disminución de la activación de las rutas de las MAPK ERK1/2 y JNK. La activación de ERK1/2 es un evento tardío en la señalización de integrinas modulada por 4F2hc seguido a la activación de PKC $\delta$  y PI3K (Melchior y col., 2008). Para determinar el papel de ERK1/2 en este proceso se trataron las células con PMA, conocido mitógeno que promueve la activación de dicha MAPK. El PMA no tiene efecto significativo sobre la expresión de la MMP-2 en las células control y silenciadas. Sin embargo, el PMA conduce a una inducción significativa de la MMP-9, como se ha descrito en la literatura para las células HeLa (Roomi y col., 2010). Así, la expresión de la MMP-2 no está determinada por el estado de activación de ERK1/2.

Durante la progresión tumoral y la transformación maligna la célula sufre un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT), que dota a la incipiente célula tumoral de propiedades invasivas y metastásicas. El orden de eventos de este mecanismo celular suele ser estocástico e independiente del tiempo, proceso que ocurre de forma controlada durante el desarrollo normal. En la transformación de la célula epitelial se van perdiendo marcadores característicos del fenotipo epitelial, a favor de la expresión de otros marcadores típicos de un fenotipo mesenquimal. Una característica molecular clave de la EMT es la represión de la expresión de la E-cadherina, molécula de adhesión presente en la mayoría de las células epiteliales normales (Figura 35A). La E-cadherina actúa como un supresor tumoral inhibiendo invasión y metástasis, siendo frecuentemente en estos procesos reprimida o degradada. Además, ciertas vías de señalización, como las de Scr, Ras, Ets, integrinas,  $\beta$ -catenina y Notch, están implicadas en la inducción de la EMT. Un aumento de las enzimas remodeladoras de la ECM, como las MMP, es uno de los primeros cambios inducidos por en la EMT. De esta forma se modulan las interacciones célula-célula y célula-matriz dotando a la célula de motilidad que le permita invadir el tejido circundante y, al final, diseminarse para colonizar otros órganos (Larue y Bellacosa, 2005; Radisky y Radisky, 2010). El silenciamiento de 4F2hc conduce a una disminución de la motilidad de las células HeLa de aproximadamente un 34%. Cabe señalar que ésta es la primera vez que se describe que 4F2hc facilita la motilidad celular modulando la expresión de la MMP-2.



**Figura 35. Representación esquemática del efecto del silenciamiento de 4F2hc sobre la progresión tumoral.** (A) Las uniones adherentes en las células epiteliales normales están mediadas por E-Cadherina. La región extracelular de esta molécula de adhesión está compuesta por 5 repeticiones tipo cadherina que unen iones  $\text{Ca}^{2+}$ . En la región distal citoplásmica se une  $\beta$ -catenina, que a través de otras proteínas se une a los filamentos de actina. Las células tumorigénicas que pierden la expresión de la E-Cadherina, van adquiriendo características mesenquimales (EMT) que conducen en último término a la diseminación tumoral. (B) Las células HeLa no expresan E-cadherina, por lo que la  $\beta$ -catenina se encuentra libre en el citoplasma. La expresión de 4F2hc asegura una correcta activación de FAK y de Akt dependiente de integrina. Esta última quinasa, a su vez, inhibe la actividad de GSK-3 $\beta$  (la cual forma un complejo en el citoplasma con APC y axina), promoviendo la translocación al núcleo de la  $\beta$ -catenina. Allí se asocia al factor de transcripción TCF/LEF y comienzan a expresarse genes implicados en ciclo celular, invasión y migración. (C) El silenciamiento de 4F2hc impide la fosforilación inhibitoria de Akt sobre GSK-3 $\beta$ , lo que conduce a su activación. GSK-3 $\beta$  fosforila a la  $\beta$ -catenina dirigiéndola hacia su ubiquitinización y posterior degradación proteasomal, disminuyendo sus niveles y afectando a la capacidad proliferativa e invasiva de las células silenciadas.

4F2hc interacciona con las integrinas  $\beta 1$  modulando la señalización dependiente de integrinas, contribuyendo a la activación de FAK que conduce a la activación de las vías Rac/Ras/Raf/ERK y de PI3K/Akt (Feral y col., 2005) (Figura 35B). Al igual que ocurre con la delección de la proteína en células madre embrionarias, el silenciamiento de 4F2hc inhibe la activación de FAK, Akt y ERK dependiente de integrinas. De hecho, también disminuye la fosforilación de la quinasa GSK-3 $\beta$ , una diana secundaria de Akt

capaz de promover la degradación proteasomal de proteínas implicadas en la EMT como  $\beta$ -catenina y Snail (Liu y col., 2002; Zhou y col., 2004) (Figura 35C).

La pérdida de E-cadherina a consecuencia de la EMT causa la liberación de  $\beta$ -catenina (que está unida a su cola citoplasmática), su estabilización y su posterior translocación al núcleo donde actúa como un factor transcripcional promoviendo la expresión de genes implicados en crecimiento y supervivencia (Liu y col., 2002). Aunque las células HeLa no expresan E-cadherina, el silenciamiento de 4F2hc no recupera su expresión. Sin embargo, en las células silenciadas se reduce la fosforilación de GSK-3 $\beta$  dependiente de Akt en el residuo de Ser<sup>9</sup>. La reducción de la fosforilación de GSK-3 $\beta$  en este residuo inhibitorio causa la activación de la quinasa, observándose además una disminución de los niveles totales de  $\beta$ -catenina. Esta situación no es consecuencia de la acumulación en el núcleo de este factor de transcripción, sino posiblemente es debido a una degradación proteasomal excesiva desencadenada por la fosforilación mediada por GSK-3 $\beta$ . Por lo tanto, el silenciamiento de 4F2hc en las células HeLa promueve una degradación excesiva de  $\beta$ -catenina que se encuentra libre en el citoplasma, evitándose la transcripción de genes implicados en la adquisición de un fenotipo invasivo y metastásico. De hecho, recientemente se ha demostrado que la inhibición de la vía de señalización Wnt a través de un shRNA frente a  $\beta$ -catenina causa la reversión de los fenotipos EMT y metastásicos inducidos por HIF1- $\alpha$  en cáncer de próstata (Zhao y col., 2011).

Adicionalmente, la represión de 4F2hc afecta a otras rutas de señalización relacionadas con cáncer. Dentro del tumor la restricción de oxígeno es clave en el control de la neovascularización, metabolismo de la glucosa, supervivencia y diseminación del tumor. Esta acción pleiotrópica está orquestada por los factores inducibles por hipoxia (Pouyssegur y col., 2006); además, se ha descrito que factores ambientales como la hipoxia regulan la EMT durante la progresión tumoral (Jiang y col., 2011). En las células silenciadas, la activación de la señalización inducida por hipoxia mediante el HIF-1 está reducida. Este factor de transcripción controla la expresión de factores angiogénicos, como el VEGF y la angiopoyetina-2, así como factores invasivos como la MMP-2, promoviendo la diseminación tumoral (Semenza, 2003). Recientemente, en cáncer de pulmón no microcítico se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre marcadores de hipoxia, la señalización mTOR y LAT1; éste

último se asocia con 4F2hc para llevar a cabo el transporte heteromérico de aminoácidos (Kaira y col., 2011).

La proteína 4F2hc se expresa en casi todos los tipos celulares, por lo que se puede considerar una proteína ubicua, siendo sus niveles mayores en tejidos muy proliferativos que están en continua renovación como el epitelio del tracto gastrointestinal y el de los túbulos proximales renales (Rossier y col., 1999; Dave y col., 2004). Ello está de acuerdo con su implicación en supervivencia y proliferación, procesos dependientes de la señalización integrina. De hecho, las células que van a proliferar incrementan de forma significativa la expresión de 4F2hc (Diaz y col., 1997). Ya que, su delección en linfocitos, células musculares de la vasculatura, queratinocitos y células madre embrionarias provoca la inhibición de la proliferación, por lo que 4F2hc se considera un marcador de la activación de la proliferación (Feral y col., 2005; Lemaitre y col., 2005; Cantor y col., 2009; Fogelstrand y col., 2009; Cantor y col., 2011). Consecuentemente, esta proteína se sobreexpresa en células tumorales así como en líneas celulares establecidas, células que manifiestan una proliferación incontrolada (Bellone y col., 1989; Dixon y col., 1990).

Distintos estudios sobre la expresión de 4F2hc en tumores de diferente origen (riñón, pulmón y células gliales) y grado de malignidad coinciden en que la sobreexpresión de la proteína se correlaciona con la progresión tumoral: se observa un incremento progresivo de la expresión de 4F2hc según aumenta la malignidad y agresividad del tumor (Prager y col., 2009; Kaira y col., 2011; Haining y col., 2012). La ubicuidad de 4F2hc en condiciones fisiológicas normales se ha confirmado mediante un *array* de tejidos, aunque su nivel de expresión y localización depende del tejido considerado. La localización de la cadena pesada en la piel se restringe al estrato basal donde se encuentran los queratinocitos con capacidad proliferativa. Independientemente de los niveles, la transformación maligna en todos los tejidos conduce a un incremento de la expresión de 4F2hc, lo que se corresponde con los datos descritos en la literatura (Hara y col., 1999; Yoon y col., 2003; Henderson y col., 2004). La localización de la proteína depende del origen del tumor, observándose en las uniones intercelulares en algunos tejidos (mama, intestino o riñón) o de forma difusa por toda la célula como sucede en el hígado.

Cabe esperar que las células diferenciadas, incluso dentro de un tumor, tengan menor expresión de 4F2hc y, por tanto, menor capacidad proliferativa. Por todo ello, se

ha determinado la expresión de 4F2hc en distintas líneas celulares de adenocarcinoma de colon establecidas en el laboratorio y que muestran diferente capacidad tumorigénica y grado de diferenciación. Las células parentales BCS-TC2 no son tumorigénicas y son poco diferenciadas (Turnay y col., 1990). Por el contrario, las distintas sublíneas obtenidas a partir de ellas son tumorigénicas, algunas proceden de metástasis, y tienen distinto grado de diferenciación (BCS-TC2~BCS-TC2.LNe< BCS-TC2.LNi< BCS-TC2.FN o BCS-TC2.BR2) (López de Silanes y col., 2004). Aunque todas las líneas celulares expresan 4F2hc, las células que proceden de metástasis no presentan una expresión total incrementada; ésta la muestra una de las sublíneas tumorigénicas (células BCS-TC2.LNe) con menor grado de diferenciación y las células diferenciadas BCS-TC2.BR2. Estos datos indican que no se puede establecer una clara correlación entre los niveles de expresión de la proteína y la tumorigenicidad intrínseca y/o grado de diferenciación en este sistema de estudio.

Para determinar el papel de 4F2hc en tumorigénesis, se silenció la expresión de 4F2hc en las sublíneas BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.2, ambas con tumorigenicidad intrínseca pero que difieren en su grado de diferenciación, mediante miRNA para evaluar cómo afecta este hecho al potencial tumorigénico de estas células. Las células BCS-TC2.BR2 son las más diferenciadas (López de Silanes y col., 2004) y las células BCS-TC2.2 expresan mayores niveles de integrina  $\beta 1$ , lo que está relacionado con su mayor capacidad tumorigénica respecto a las células parentales (López-Conejo y col., 1996). A pesar de esas diferencias, el nivel de expresión de 4F2hc es similar entre ambas. El silenciamiento de 4F2hc afecta al crecimiento tumoral *in vivo* de las células, observándose una reducción del tamaño de la masa tumoral de entre el 50-75% dependiendo del número de células inyectadas. La cinética de crecimiento tumoral de las células silenciadas transcurre de forma paralela a las células control en ambos casos. Esto puede estar relacionado con que las células control y silenciadas muestren la misma velocidad de proliferación y densidad de saturación *in vitro* en condiciones normales de cultivo. Sin embargo, los ensayos de tumorigenicidad en ratones ponen de manifiesto la existencia de un retraso del crecimiento de las células en la fase de latencia, que puede explicarse a través del comportamiento de las células silenciadas *in vitro* ante condiciones restrictivas de suero. En este caso, en la fase de saturación estas células se afectan por una menor disponibilidad de nutrientes y, como consecuencia, las células silenciadas mueren. Por lo tanto, la disponibilidad de nutrientes y mitógenos en el medio parece ser clave en las células silenciadas para promover su

proliferación, lo que podría relacionarse con la función de 4F2hc posibilitando el transporte heteromérico de aminoácidos en la membrana plasmática, necesitando grandes cantidades de aminoácidos para lograr un crecimiento sostenido.

La expresión de 4F2hc también se ha evaluado en otras células de adenocarcinoma de colon con y sin capacidad tumorigénica así como en las células de colon normal FHC y otras líneas tumorales de distinto origen. 4F2hc también se expresa en estas células, aunque su nivel de expresión puede variar dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo. Curiosamente, al comparar la expresión de la proteína en todas las líneas celulares se observan diferencias en la movilidad electroforética posiblemente debido a un diferente patrón de glicosilación o a la existencia de isoformas de la cadena pesada. 4F2hc contiene en su C-terminal, concretamente en el dominio A, 4 posibles sitios de N-glicosilación (Asn<sup>264/280/323/405</sup>); todos ellos se encuentran expuestos, y ninguno se localiza cerca de la superficie del ectodominio que queda enfrentada a la membrana plasmática (Fort y col., 2007). Tanto la desglicosilación enzimática como la inhibición de la glicosilación en proteínas recién sintetizadas indican la potencial existencia de dos isoformas de la proteína en las células HeLa de 50 y 60 kDa. Ello concuerda con las masas moleculares teóricas calculadas a partir de las potenciales isoformas de la proteína 4F2hc recogidas en la base de datos *Gene* del NCBI. Sin embargo, la desglicosilación de la proteína en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 da lugar a una banda mayoritaria de ~60 kDa. Todo ello indica la potencial existencia de isoformas de 4F2hc en células, cuya expresión parece ser dependiente del tipo celular.

Aparte de ser una proteína de membrana con un *turnover* de unos 4 días, entre las modificaciones glicídicas sufridas por la proteína no se encuentran oligosacáridos ricos en manosa. Por lo tanto, el patrón de glicosilación de 4F2hc parece ser más complicado cuanto mayor malignidad muestren las células. En realidad, la transformación maligna frecuentemente altera el proceso de glicosilación (Hakomori, 1996), incrementándose el nivel de truncación y las ramificaciones de los oligosacáridos así como la expresión de secuencias terminales inusuales (Kim y Varki, 1997). Asimismo, como resultado de un estudio para la identificación de glicanos específicos asociados a tumor, se identificó a 4F2hc como el primer portador de los glicanos Lewis<sup>x</sup> y Lewis<sup>y/b</sup> en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, incluyendo estructuras altamente fucosiladas y multiramificadas (Powlesland y col., 2009). Comparando la



expresión de 4F2hc en células no tumorigénicas (BCS-TC2, SW1417 y FHC) de colon con las tumorigénicas, se podría concluir que en las no tumorigénicas el grado de glicosilación de 4F2hc es inferior y similar entre ellas. Sin embargo, aunque las células FHC han sido consideradas como células control frente a las células tumorales de colon humano, recientemente se ha descrito que exhiben un fenotipo tumorigénico con una mutación en *TP53* (Soucek y col., 2010). Por ello, podría cuestionarse la posible relación entre el grado de glicosilación y la tumorigenicidad de las células de colon.

Como ya se ha comentado la interacción de 4F2hc con las integrinas  $\beta 1$  parece ser clave en el proceso tumorigénico (Rintoul y col., 2002; Henderson y col., 2004; Feral y col., 2005). Se ha descrito que esta interacción tiene lugar en dominios de membrana de baja densidad, también conocidos como *rafts* (Kolesnikova y col., 2001). Estos microdominios lipídicos ordenados están compuestos principalmente por glicoesfingolípidos entre los que se encuentran intercaladas moléculas de colesterol y, además, proteínas implicadas en la transducción de señales, de ahí que se consideren plataformas de señalización (Brown y London, 2000; Patra, 2008). La interacción de 4F2hc con integrinas  $\beta 1$  en las células BCS-TC2, BCS-TC2.BR2 y HeLa. En cambio, la integrina  $\beta 1$  se expresa mayoritariamente en las fracciones densas.

Sin embargo, 4F2hc podría estar formando parte de otros dominios de membrana como aquéllos que están enriquecidos en tetraspaninas. Estas moléculas de 4 segmentos transmembrana, de ahí su nombre, se asocian lateralmente entre ellas y, a su vez, con otras proteínas formando dominios que se conocen como redes de tetraspanina, que están implicados en señalización. CD9 es una de estas tetraspaninas que, además, interacciona con la integrina  $\beta 1$  (Gutiérrez-López y col., 2003). En las células BCS-TC2 se ha observado la colocalización de 4F2hc con CD9, posiblemente formando parte de la red de tetraspaninas, si bien los ensayos de inmunoprecipitación indican que la interacción entre ambas no es directa. Recientemente, se ha demostrado que 4F2hc está insertado en microdominios enriquecidos en tetraspaninas, aunque la presencia de 4F2hc en los inmunoprecipitados de CD9 y viceversa es menor que la encontrada para otras proteínas que se asocian con esta tetraspanina, sugiriendo que la asociación directa de 4F2hc puede tener lugar con una proteína diferente (Dominguez y col., 2010). Probablemente se establezca a través de las integrinas  $\beta 1$ , ya que éstas se asocian con distintas tetraspaninas.

### **5.3. EFECTOS DE COMPONENTES DEL LUMEN INTESTINAL SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON**

Un controlado balance entre proliferación, diferenciación y apoptosis permite una correcta homeostasis de la mucosa gastrointestinal. Las células de la mucosa se encuentran en contacto directo con los componentes del lumen intestinal, pudiendo éstos influir en los procesos que regulan el mantenimiento de la fisiología normal del epitelio. El butirato, uno de los agentes que se encuentran en el lumen, es un producto de la fermentación anaeróbica de la fibra de la dieta que regula la homeostasis del epitelio: además de ser la principal fuente de energía de los colonocitos, induce la diferenciación y apoptosis de las células, ejerciendo un papel citoprotector frente a la carcinogénesis colorrectal. Asimismo, en el lumen existen otros agentes que ejercen una acción citotóxica sobre las células del epitelio intestinal como los ácidos biliares y productos bacterianos como el LPS.

La adquisición de resistencia a los efectos citotóxicos inducidos por estos agentes es uno de los mecanismos empleados por las células transformadas, para evitar el control fisiológico y favorecer la progresión tumoral (Miller, 2004). Se han utilizado principalmente las células parentales BCS-TC2 y las células resistentes BCS-TC2.BR2 en los estudios que componen este bloque de resultados. Un estudio comparativo de los perfiles de expresión génica de ambos tipos celulares revela la existencia de un conjunto de genes, implicados en la inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación celular, cuya expresión se encuentra reducida en las células BCS-TC2.BR2, así como muestra una sobreexpresión de genes relacionados con protección frente a distintos tipos de estrés (Olmo y col., 2007). Las células resistentes tienen mayores niveles basales de HSP70 y en menor medida, de HSP60, lo que puede contribuir al mantenimiento de la viabilidad tras un choque térmico moderado, ya que estas proteínas están implicadas en protección celular contra el choque térmico o el daño mitocondrial, respectivamente. Por el contrario, la viabilidad de las células BCS-TC2 se reduce, lo que probablemente es consecuencia de la apoptosis inducida por choque térmico moderado, efecto que ya se ha descrito en distintas líneas celulares (Goto y col., 1999). Si se utilizan condiciones más severas se induce principalmente necrosis (Li y col., 1999). En este caso se reduce de forma acusada la viabilidad de las células parentales, mientras que mueren menos del 20% de las células resistentes y la inducción de HSP70 es aún mayor que en el caso del choque térmico moderado. Por lo

tanto, la resistencia a la muerte celular inducida por choque térmico puede deberse a unos altos niveles basales de algunas HSP, ya que su represión inhibe la proliferación y la inducción de apoptosis (Wei y col., 1995). Asimismo, las células BCS-TC2.BR2 muestran resistencia a la muerte celular inducida por otros componentes del lumen intestinal como los ácidos biliares DCA y CDCA, y el lipopolisacárido bacteriano. Aunque se puede llegar a observar apoptosis y necrosis primaria y secundaria, estos procesos son mucho más acusados en el caso de las células sensibles a butirato (Olmo y col., 2007).

En las células parentales los ácidos biliares inducen estrés oxidativo incrementando la generación de ROS principalmente por activación de las NAD(P)H oxidasas presentes en la membrana plasmática. Ello conduce a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y a una activación de caspasas y Bax, que amplifican el proceso apoptótico. Como consecuencia, se reduce la fosforilación oxidativa y, en las condiciones *in vitro*, se induce necrosis por falta de ATP (Barrasa y col., 2011).

Por el contrario, la viabilidad de ambos tipos celulares después de sufrir un estrés osmótico es similar (Olmo y col., 2007). Sin embargo, hay diferencias significativas en la respuesta de las células al estrés osmótico mediante la activación de ERK1/2 (Sheikh-Hamad y Gustin, 2004), observándose la activación de esa quinasa en las células BCS-TC2 y casi ningún efecto sobre las células resistentes. Por lo tanto, las células BCS-TC2.BR2 no son exclusivamente resistentes a los efectos apoptóticos inducidos por el butirato y al estrés metabólico que conlleva la eliminación de glucosa del medio de cultivo (López de Silanes y col., 2004), sino que también son resistentes a la muerte celular inducida por estrés térmico, osmótico y por otros agentes citotóxicos presentes en el lumen intestinal (Olmo y col., 2007). Además, otros estudios han demostrado que el tratamiento con butirato produce un aumento en la expresión de diversas proteínas relacionadas con un fenotipo resistente como MDR1 (Jin y Scotto, 1998) y MVP (*Major Vault Protein*) (Shimamoto y col., 2006). Todos estos datos apuntan a que la adquisición de la resistencia a butirato da lugar a un fenotipo multirresistente que permitiría a las células BCS-TC2.BR2 no afectarse por potenciales carcinógenos a los que están expuestas en el lumen y por consiguiente favorecer la carcinogénesis colorrectal (Olmo y col., 2007). La elucidación de los mecanismos moleculares que conducen a esta resistencia contribuiría de forma significativa al desarrollo de nuevas

drogas antitumorales, siendo este sistema modelo celular una herramienta útil para lograrlo.

Un primer proceso analizado es la captura del butirato, ya que defectos en la misma reducirían su concentración intracelular facilitando la adquisición de resistencia a los efectos apoptóticos inducidos por este agente. Además de la difusión pasiva, también se ha descrito el transporte de butirato mediado por transportador. Se ha identificado un transporte saturable de baja afinidad en células de adenocarcinoma de colon AA/C1 (Cuff y col., 2002) y Caco-2 (Hadjigapiou y col., 2000; Stein y col., 2000), cuyas constantes de afinidad se encuentran en el rango de milimolar. En las células BCS-TC2 se ha observado la existencia de dos mecanismos diferentes de transporte mediados por transportador, y que son claves, en distintas situaciones fisiológicas. Uno de ellos es un sistema de baja afinidad/alta capacidad que realiza su actividad transportadora a altas concentraciones de butirato (mM), mediado por un antiporte butirato/bicarbonato con una posible contribución de AE2 y MCT4. Por otro lado, en períodos intercomidas o en ayuno, tendría lugar a bajas concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) un sistema de alta afinidad/baja capacidad que corresponde a un co-transporte  $\text{H}^+$ /monocarboxilato, dependiente de energía y activado vía PKC $\delta$ . Este transporte de alta afinidad también se encuentra en las células BCS-TC2.BR2 y en otras células de adenocarcinoma de colon (HT-29 y Caco-2), así como en las células FHC. Este transporte de butirato, a bajas concentraciones, se ajusta a las propiedades del co-transporte mediado por la familia MCT. En realidad, se ha observado que el tratamiento con butirato tanto en las células parentales como en las resistentes induce un incremento de la expresión de MCT1 dependiente de tiempo y de concentración. Además, su silenciamiento ha confirmado su implicación en el transporte de alta afinidad (Lecona y col., 2008).

El butirato inhibe la progresión del ciclo celular e induce diferenciación y apoptosis en células transformadas (Navarro y col., 1997; Olmo y col., 2007). Estos efectos pueden ser ejercidos principalmente a partir de cambios en la expresión génica promovidos por su acción inhibitoria sobre las HDAC (Gibson y col., 1999; Williams y col., 2003; Daly y Shirazi-Beechey, 2006). Estos se deberían a que el butirato promueve la hiperacetilación de histonas facilitando la expresión de los genes regulados por este agente (aquellos que contienen sitios Sp1/Sp3 o cajas CCAAT en sus promotores) (Pace y col., 2000; Davie, 2003; Haner y col., 2010). Además de la regulación del estado de

acetilación de histonas por las HAT y las HDAC, se ha descrito que se puede producir la acetilación de proteínas no histonas en residuos de lisinas, modificando su actividad o su afinidad de unión a promotores (Glozak y col., 2005). De acuerdo al análisis comparativo de los perfiles de expresión génica entre las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2, el gen *ANXA1* se sobreexpresa en las células resistentes (Olmo y col., 2007). La inducción de la anexina A1 por butirato está mediada por una activación de p53 dependiente de p38 MAPK y una liberación de NF- $\kappa$ B de la caja CCAAT de su promotor (Lecona y col., 2008). Teniendo en cuenta que el estado de acetilación de las histonas y de factores de transcripción está probablemente implicado en la regulación transcripcional de los genes de las MMP (Clark y col., 2007), se ha estudiado el efecto de los inhibidores de las HDAC sobre la expresión de la MMP-11. El promotor del gen *MMP11* se caracteriza por presentar varias cajas CG, que son potenciales sitios de unión de Sp1. De hecho, hemos observado que este factor de transcripción forma un heterocomplejo con Smad2 regulando la expresión basal del promotor de *MMP11* a través de cajas GC en las células BCS-TC2. Además, Sp1 es esencial en la activación transcripcional del promotor inducida por el tratamiento con inhibidores de las HDAC. Estos agentes inducen la acetilación de Smad2, lo que promueve la formación de complejos Sp1/Smad2 que se unen a la región proximal del promotor mediando la activación transcripcional de *MMP11* que, a su vez, es dependiente de la activación de ERK1/2 (Barrasa y col., 2012).

El butirato también es capaz de alterar la metilación del DNA, la fosforilación de histonas y la transducción de señales, como se ha descrito en la literatura (Bolden y col., 2006). Respecto a los mecanismos de señalización intracelular responsables de los efectos anticarcinogénicos del butirato sobre las células transformadas se han encontrado diferencias entre las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2. El comportamiento celular en respuesta a estímulos externos es mediado por vías de señalización intracelulares como las MAPK. Estas vías son críticas en tumorigénesis ya que regulan proliferación celular y migración (Johnson y Lapadat, 2002). La activación de ERK se asocia con proliferación, diferenciación y supervivencia celular, habiéndose observado altos niveles de activación de esta quinasa en células de cáncer colorrectal. En contraste, p38 y JNK están implicadas en parada del ciclo celular y, en algunos contextos, apoptosis (Assefa y col., 2000; Tournier y col., 2000; Johnson y Lapadat, 2002; Zhang y col., 2010).

El tratamiento con butirato inhibe la fosforilación de ERK1/2 en las células BCS-TC2 de forma dependiente de tiempo y concentración, pero los niveles de fosfo-ERK1/2 no se modifican significativamente en las células resistentes, aunque los niveles basales de activación son algo inferiores a las células resistentes. Ello puede sugerir una potencial correlación con la inducción de apoptosis. En estudios similares utilizando también células de adenocarcinoma de colon como HT-29 y Caco-2, así como células de otro origen, se ha observado que el butirato induce una inactivación de ERK1/2 a partir de las 12 h de tratamiento que se mantiene, al menos, hasta las 72 h, si las células no han muerto (Witt y col., 2000; Ding y col., 2001; Jung y col., 2005; Lim y col., 2009). Un comportamiento similar al de las BCS-TC2.BR2 se ha descrito en una sublínea de células de leucemia humana resistente a los efectos del butirato (K562r); tampoco se observa en ellas un efecto inducido por butirato sobre la señalización de ERK1/2 (Witt y col., 2000). La preincubación de las células resistentes con un inhibidor de ERK1/2 (PD98059), disminuye la viabilidad de estas células, haciéndolas sensibles a la muerte celular inducida por butirato. Por lo tanto, el tratamiento de las células parentales BCS-TC2 con PMA incrementa los niveles de fosforilación de ERK1/ y contrarresta parcialmente los efectos del butirato sobre dicha fosforilación, lo que se traduce en un incremento en la viabilidad celular frente a butirato. El uso de inhibidores/activadores bloquea de forma eficiente la apoptosis inducida por butirato restaurando la activación de ERK1/2 en células epiteliales de rata WB (Jung y col., 2005). Por lo tanto, la sostenida activación de ERK1/2 en las células BCS-TC2.BR2 en presencia de butirato puede relacionarse con un mecanismo de supervivencia y resistencia a la apoptosis.

Las células BCS-TC2 responden a la presencia de butirato a tiempos cortos tratando de adaptarse a su presencia en el medio con una activación progresiva de ERK1/2 cuyo máximo se alcanza los 60 min, y aunque como se ha comentado, posteriormente decae. Igualmente se observa un aumento de la fosforilación de Akt que muestra el mismo comportamiento que ERK1/2. Aunque en las células resistentes también se observa un incremento en la fosforilación de ERK1/2 y Akt, los niveles acaban descendiendo a las condiciones basales. Esta activación transitoria de ERK1/2 y Akt inducida por butirato se ha observado en distintos sistemas celulares (Davido y col., 2001; Jung y col., 2005; Shah y col., 2006; Chen y col., 2007). En las células PC12 tratadas con butirato se observan unos niveles máximos de fosforilación de ERK1/2 entre los 10 y 30 min, para luego decrecer progresivamente (Shah y col., 2006). El

butirato induce la activación transcripcional y, por tanto, la expresión proteica de p21 tanto en células BCS-TC2 como en BCS-TC2.BR2 induciendo una parada de ciclo, a la vez que disminuye la fosforilación de ERK1/2. Los cambios en ERK1/2 coinciden con un aumento de la expresión dicho inhibidor del ciclo celular.

El descenso de la activación de ERK1/2 en células HT-29 es previo a la inducción de marcadores de diferenciación como la fosfatasa alcalina (Davido y col., 2001). Además, la inducción del marcador de diferenciación anexina A1 por butirato requiere la activación de p38 MAPK (Lecona y col., 2008). Se podría proponer que la estimulación de la expresión de p21 por butirato podría conducir a la célula a sufrir apoptosis o bien la sacaría del ciclo celular promoviendo su diferenciación. En el proceso de diferenciación inducido por butirato en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 está implicada la activación de p38 MAPK, ya que tanto la actividad de fosfatasa alcalina como la expresión de dipeptidilpeptidasa IV (marcadores ambos de diferenciación) disminuyen de forma dependiente de concentración en presencia de un inhibidor específico de p38 MAPK. Ello concuerda con un aumento de la fosforilación de dicha quinasa a las 24 y 48 h (Ding y col., 2001). Además, p38 MAPK no sólo está implicada en la diferenciación intestinal inducida por butirato, sino también en la inducida por oligosacáridos o por la proteína Schlafen-3 (proteína que actúa como supresor del crecimiento celular manteniendo quiescencia) (Kuntz y col., 2009; Yuan y col., 2010). La activación transcripcional de p21 mediada por butirato en ambas líneas celulares, que es mayor en el caso de las células sensibles, no está mediada por la activación de p38 MAPK.

Otra de las rutas de señalización importantes para las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 en condiciones basales es JNK. Además, se ha descrito que el tratamiento con los inhibidores de las HDAC estimulan la activación transcripcional de esta MAPK dependiente de AP-1. Distintos autores han demostrado que el butirato induce apoptosis inducida por estrés mediante la activación de JNK de forma dependiente de concentración y tiempo y, además, su fosforilación podría estar implicada en la diferenciación inducida por butirato (Ding y col., 2001; Zhang y col., 2010). Igualmente se ha descrito la correspondencia entre la estimulación de la expresión de JNK1 y p21 durante la diferenciación espontánea de células de cáncer de colon (Tong y col., 2007). En nuestro caso, al no detectar la proteína fosforilada por *Western blot*, tal vez por problemas de especificidad de los anticuerpos, se ha valorado la implicación de JNK sobre la activación transcripcional de p21 inducida por butirato. Tanto en las células

sensibles como en las resistentes a butirato la presencia de un inhibidor específico de JNK no disminuye la inducción de *p21*. Así, no se puede determinar con exactitud el papel de JNK en los efectos mediados por butirato en estas células.

Las roturas de la doble hebra del DNA activan a una serina/treonina quinasa denominada ATM (*A*taxia *T*elangiectasia *M*utated), la cual fosforila y activa a varias dianas como p53, BRCA1 (*B*Reast *C*ANcer gene 1), CHK2 (*C*SK-*H*omologous *K*inase 2) o la histona H2AX dando lugar a  $\gamma$ H2AX. Estas proteínas actúan como puntos de control dentro del ciclo celular para intentar reparar los defectos encontrados en el DNA o, si no es posible, inducir apoptosis.  $\gamma$ H2AX es el marcador específico empleado para la detección de las roturas de doble hebra del DNA (Sarkar, 2009). La proteína p53 es una de las principales dianas proteicas no histonas que sufre acetilación, y el butirato y otros inhibidores de las HDAC incrementan su acetilación promoviendo su actividad transcripcional (Janson y col., 1997; Roy y col., 2005). Dicha activación desencadena un bucle de retroalimentación que promueve la degradación de p53. El butirato induce una degradación dependiente de tiempo en las células BCS-TC2, siendo los efectos mucho más moderados en las células resistentes.

Los inhibidores de las HDAC inducen la activación transcripcional de p53, lo que a su vez conduce a su propia degradación y, además, son capaces de prolongar la expresión de  $\gamma$ H2AX en las células normales y transformadas, favoreciendo la inhibición de la reparación de las roturas de doble hebra del DNA y potenciando los efectos de la radiación (Camphausen y col., 2004; Camphausen y Tofilon, 2007; Purucker y col., 2010). En nuestro sistema de estudio, el butirato induce la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) tanto en células parentales como en las resistentes, siendo en este caso más tardía. Estos hechos explicarían el efecto paradójico del butirato sobre las células del epitelio colónico. En la carcinogénesis colorrectal se acumulan frecuentemente mutaciones en los genes que codifican los componentes de la maquinaria de reparación del DNA (Radtko y col., 2006). El butirato, y otros inhibidores de las HDAC inducen daño en el DNA, que las células transformadas son incapaces de reparar. Ello es debido a las mutaciones en el sistema de reparación o a que los propios agentes reducen la expresión de los componentes de la maquinaria de reparación (Subramanian y col., 2005). Sin embargo, las células normales tras detectar el daño en el DNA lo repararían y continuarían su ciclo normal. El uso de un derivado del butirato, etil-4-isotiocianatobutanoato, se ha asociado con daño en el DNA, actividad proteasomal e inducción de p53 y p21, en células de leucemia deficientes en



MMR (Bodo y col., 2006). Por lo tanto, la adquisición de resistencia a estos agentes permite la supervivencia de estas células malignas.

Asimismo se ha estudiado el efecto del butirato, y otros inhibidores de las HDAC, como la TSA y el SAHA, sobre otras vías de señalización. La vía de señalización Wnt en condiciones basales se encuentra más activa en las células parentales BCS-TC2 y, además, se activa transcripcionalmente en presencia de los inhibidores de las HDAC independientemente de la línea celular. De hecho, en células de cáncer de colon con mutaciones en componentes de la vía canónica de Wnt se hiperactiva esta ruta en presencia de inhibidores de las HDAC como butirato, SAHA, MS275 y TSA. En ese caso existe una relación entre los niveles de actividad de Wnt y la apoptosis inducida por butirato en estas células (Lazarova y col., 2004; Bordonaro y col., 2007). Sin embargo, una prolongada exposición de las células HCT-116 a butirato provoca la adquisición de resistencia a los efectos apoptóticos y a la activación de Wnt/ $\beta$ -catenina inducidos por este agente, así como a otros inhibidores de las HDAC estructuralmente diferentes. Se ha propuesto que esta resistencia se desencadena a través de un aumento de la señalización Wnt independiente de  $\beta$ -catenina (no canónica) (Bordonaro y col., 2011).

Además, se ha detectado la activación de NF $\kappa$ B y los factores Myc/Max, factores de transcripción relacionados con la supervivencia y la proliferación celular, respectivamente. Se ha descrito que las HDAC1/2 forman complejos represores inhibiendo la actividad del factor de transcripción Mad/Max y, dado que Mad antagoniza la función biológica y transcripcional en los sitios de unión de Myc/Max (Laherty y col., 1997), cabe esperar una activación transcripcional de este último mediada por los inhibidores de las HDAC. Posiblemente la célula promueve en principio una respuesta adaptativa al inhibidor de HDAC, de ahí el incremento observado de la señalización durante las primeras 24 h de tratamiento al igual que lo observado para ERK1/2 y Akt. Aunque se ha descrito que la fosforilación de esta MAPK en respuesta a butirato es dependiente de cAMP y no de PKC/Ca<sup>2+</sup> en células PC12 (Shah y col., 2006), no se observa una activación significativa de la actividad transcripcional del factor CREB (*cAMP response element-binding*). Asimismo sorprende la activación de la señalización dependiente de hipoxia en ambos tipos celulares, ya que se ha descrito que el butirato suprime la activación de HIF-1 en células epiteliales intestinales bajo condiciones hipóxicas, suprimiendo la expresión de genes de respuesta a hipoxia como los implicados en angiogénesis (Miki y col., 2004; Kim y col.,

2007). Por lo tanto, los inhibidores de las HDAC tienen efectos pleiotrópicos sobre la señalización intracelular, necesitándose un estudio más detallado de cada ruta de transducción de señales para entender todos sus efectos.

Respecto al mecanismo de inducción de apoptosis por los inhibidores de las HDAC, en las células de cáncer de colon RKO el butirato induce la activación de caspasa-9 y -3 promoviendo la disminución de la expresión de Bcl-2 así como una inducción de la proteína proapoptótica Bax de una manera dependiente de concentración, donde además JNK desempeña un papel importante (Zhang y col., 2010). También se ha descrito que los inhibidores de las HDAC promueven la vía extrínseca de apoptosis sensibilizando a la célula mediante la activación de TRAIL. Así, un incremento en la activación de caspasa-9 confiere sensibilidad a la apoptosis inducida por ácido valproico o TSA mediante TRAIL. Ello viene acompañado de una activación de Bid, elevados niveles de Bax y reducidos de Bcl-X<sub>L</sub> (Fulda, 2012). Con los datos disponibles no se ha podido establecer un mecanismo de apoptosis en nuestras células, si bien el tratamiento con distintos inhibidores de las HDAC durante 24 h induce en ambas líneas un claro incremento de p21 y una degradación de p53. Además se observa una ligera disminución de Bid y activación de caspasas (sobre todo en las células parentales). Previamente en el grupo se ha observado que las células BCS-TC2.BR2 muestran mayores niveles basales de Bcl-2 que las células parentales, lo que podría dar cuenta de su resistencia a los efectos apoptóticos inducidos por el butirato. Así, sería interesante conocer qué ocurre a tiempos más largos para intentar dilucidar el mecanismo por el que los inhibidores de las HDAC, y particularmente el butirato, inducen la muerte celular en las células BCS-TC2 así como entender cómo las células BCS-TC2.BR2 son capaces de resistir a ella.

## 6. Conclusiones



## CONCLUSIONS

1. Structural/spectroscopic characterization of 4F2hc-ED in solution reveals a compact and thermally stable structure, similar to that described for its crystal structure. By itself the ectodomain is unable to form homodimers in solution. Moreover, folding/unfolding involve two intermediate states: a molten globule-like structure and an almost unfolded state with residual  $\beta$ -strands. Folding seems to be directed by initial formation of hydrophobic clusters.
2. 4F2hc is involved in tumorigenesis in HeLa cells, in fact, it seems to be crucial for survival and proliferation. Moreover, 4F2hc participates in tumor progression, favoring first steps of epithelial-mesenchymal transition, by means of inhibition of  $\beta$ -catenin proteasomal degradation through Akt/GSK-3 $\beta$  signaling and enabling cell motility.
3. 4F2hc is expressed in most tissues, mainly in highly proliferative such as colon and small intestine and, furthermore its overexpression in tumors is irrespective of tissue origin. Despite no clear correlation is found between 4F2hc protein expression in colon adenocarcinoma cell lines and distinct tumorigenic capacity or differentiation degree, it is observed a different glycosylation pattern. 4F2hc deglycosylation in HeLa cells reveals potential protein isoforms.
4. Cytotoxic effects induced by bile acids in BCS-TC2 cells firstly trigger apoptosis through disruption of mitochondrial function by ROS generation and Bax oligomerization. BCS-TCS.BR2 cells show resistance not only to apoptotic effects induced by butyrate, but also to other types of stress (metabolic, thermal or osmotic), as well as to cytotoxic effects induced by other luminal components such as bile acids or LPS. Butyrate resistance in these cells cannot be attributed to an impaired transport of this agent. Moreover, it regulates gene expression by acetylation of non-histone proteins such as Smad2, which forms complexes with Sp1 to induce transcriptional activation of *MMP11* gene in BCS-TC2 cells.
5. Many signaling pathways are altered by HDAC inhibitors. Butyrate causes an early pro-survival signaling, which later on falls off as a consequence of apoptosis in BCS-TC2 cells, whereas BCS-TC2.BR2 cells remains mainly unaffected. Despite butyrate resistance, these cells also suffer DNA double strand breaks.

## 7. *Bibliografía*



- Adcock I. M. HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents. *Br J Pharmacol* 2007; **150**: 829-31.
- Alrawi S. J., Schiff M., Carroll R. E., Dayton M., Gibbs J. F., Kulavlat M., Tan D., Berman K., Stoler D. L., y Anderson G. R. Aberrant crypt foci. *Anticancer Res* 2006; **26**: 107-19.
- Anand P., Kunnumakkara A. B., Sundaram C., Harikumar K. B., Tharakan S. T., Lai O. S., Sung B., y Aggarwal B. B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008; **25**: 2097-116.
- Andreotti G., Cubellis M. V., Palo M. D., Fessas D., Sannia G., y Marino G. Stability of a thermophilic TIM-barrel enzyme: indole-3-glycerol phosphate synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem J* 1997; **323** ( Pt 1): 259-64.
- Assefa Z., Vantieghem A., Garmyn M., Declercq W., Vandenabeele P., Vandenheede J. R., Bouillon R., Merlevede W., y Agostinis P. p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 21416-21.
- Bajor A., Gillberg P. G., y Abrahamsson H. Bile acids: short and long term effects in the intestine. *Scand J Gastroenterol* 2010; **45**: 645-64.
- Balasubramanian S., Verner E., y Buggy J. J. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? *Cancer Lett* 2009; **280**: 211-21.
- Barrasa J. I., Olmo N., Pérez-Ramos P., Santiago-Gómez A., Lecona E., Turnay J., y Antonia Lizarbe M. Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells. *Apoptosis* 2011; **16**: 1054-67.
- Barrasa J. I., Olmo N., Santiago-Gómez A., Lecona E., Anglard P., Turnay J., y Lizarbe M. A. Histone deacetylase inhibitors upregulate MMP11 gene expression through Sp1/Smad complexes in human colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1823**: 570-81.
- Bellone G., Alloatti G., Levi R., Geuna M., Tetta C., Peruzzi L., Letarte M., y Malavasi F. Identification of a new epitope of the 4F2/44D7 molecular complex present on sarcolemma and isolated cardiac fibers. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 1-8.
- Berditchevski F., Chang S., Bodorova J., y Hemler M. E. Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J Biol Chem* 1997; **272**: 29174-80.
- Bernstein H., Bernstein C., Payne C. M., y Dvorak K. Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 3329-40.
- Bernstein H., Bernstein C., Payne C. M., Dvorakova K., y Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res* 2005; **589**: 47-65.
- Berrier A. L., y Yamada K. M. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 2007; **213**: 565-73.
- Bertran J., Magagnin S., Werner A., Markovich D., Biber J., Testar X., Zorzano A., Kuhn L. C., Palacín M., y Murer H. Stimulation of system y(+)-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 5606-10.
- Bertran J., Werner A., Moore M. L., Stange G., Markovich D., Biber J., Testar X., Zorzano A., Palacín M., y Murer H. Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 5601-5.
- Birt D. F., Kris E. S., Choe M., y Pelling J. C. Dietary energy and fat effects on tumor promotion. *Cancer Res* 1992; **52**: 2035s-9s.
- Biswas C., Zhang Y., DeCastro R., Guo H., Nakamura T., Kataoka H., y Nabeshima K. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 1995; **55**: 434-9.



- Bodo J., Jakubikova J., Chalupa I., Bartosova Z., Horakova K., Floch L., y Sedlak J. Apoptotic effect of ethyl-4-isothiocyanatobutanoate is associated with DNA damage, proteasomal activity and induction of p53 and p21cip1/waf1. *Apoptosis* 2006; **11**: 1299-310.
- Boffetta P., y Nyberg F. Contribution of environmental factors to cancer risk. *Br Med Bull* 2003; **68**: 71-94.
- Bolden J. E., Peart M. J., y Johnstone R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 769-84.
- Bordonaro M., Lazarova D. L., y Sartorelli A. C. The activation of beta-catenin by Wnt signaling mediates the effects of histone deacetylase inhibitors. *Exp Cell Res* 2007; **313**: 1652-66.
- Bordonaro M., Tewari S., Cicco C. E., Atamna W., y Lazarova D. L. A switch from canonical to noncanonical Wnt signaling mediates drug resistance in colon cancer cells. *PLoS One* 2011; **6**: e27308.
- Borthakur A., Anbazhagan A. N., Kumar A., Raheja G., Singh V., Ramaswamy K., y Dudeja P. K. The probiotic *Lactobacillus plantarum* counteracts TNF- $\alpha$ -induced downregulation of SMCT1 expression and function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; **299**: G928-34.
- Borthakur A., Gill R. K., Hodges K., Ramaswamy K., Hecht G., y Dudeja P. K. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits butyrate uptake in Caco-2 cells by altering the apical membrane MCT1 level. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**: G30-5.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-54.
- Brown D. A., y London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000; **275**: 17221-4.
- Burkitt D. P. Related disease--related cause? *Lancet* 1969; **2**: 1229-31.
- Busk M., Pytela R., y Sheppard D. Characterization of the integrin  $\alpha$  v  $\beta$  6 as a fibronectin-binding protein. *J Biol Chem* 1992; **267**: 5790-6.
- Calonge M. J., Gasparini P., Chillaron J., Chillon M., Gallucci M., Rousaud F., Zelante L., Testar X., Dallapiccola B., Di Silverio F., y et al. Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 1994; **6**: 420-5.
- Camphausen K., Burgan W., Cerra M., Oswald K. A., Trepel J. B., Lee M. J., y Tofilon P. J. Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of gammaH2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275. *Cancer Res* 2004; **64**: 316-21.
- Camphausen K., y Tofilon P. J. Inhibition of histone deacetylation: a strategy for tumor radiosensitization. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 4051-6.
- Canani R. B., Costanzo M. D., Leone L., Pedata M., Meli R., y Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2011; **17**: 1519-28.
- Canani R. B., Terrin G., Cirillo P., Castaldo G., Salvatore F., Cardillo G., Coruzzo A., y Troncone R. Butyrate as an effective treatment of congenital chloride diarrhea. *Gastroenterology* 2004; **127**: 630-4.
- Cantor J., Browne C. D., Ruppert R., Feral C. C., Fassler R., Rickert R. C., y Ginsberg M. H. CD98hc facilitates B cell proliferation and adaptive humoral immunity. *Nat Immunol* 2009; **10**: 412-9.
- Cantor J., Slepak M., Ege N., Chang J. T., y Ginsberg M. H. Loss of T cell CD98 H chain specifically ablates T cell clonal expansion and protects from autoimmunity. *J Immunol* 2011; **187**: 851-60.
- Carling D. AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie* 2005; **87**: 87-91.
- Cea M., Soncini D., Fruscione F., Raffaghello L., Garuti A., Emionite L., Moran E., Magnone M., Zoppoli G., Reverberi D., Caffa I., Salis A., Cagnetta A., Bergamaschi M., Casciaro S., Pierri I., Damonte G., Ansaldi F., Gobbi M., Pistoia V., Ballestrero A., Patrone F., Bruzzzone S., y

- Nencioni A. Synergistic interactions between HDAC and sirtuin inhibitors in human leukemia cells. *PLoS One* 2011; **6**: e22739.
- Clark I. M., Swingler T. E., y Young D. A. Acetylation in the regulation of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression. *Front Biosci* 2007; **12**: 528-35.
- Comalada M., Bailon E., de Haro O., Lara-Villoslada F., Xaus J., Zarzuelo A., y Galvez J. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; **132**: 487-97.
- Cook S. I., y Sellin J. H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; **12**: 499-507.
- Cox M. A., Jackson J., Stanton M., Rojas-Triana A., Bober L., Lavery M., Yang X., Zhu F., Liu J., Wang S., Monsma F., Vassileva G., Maguire M., Gustafson E., Bayne M., Chou C. C., Lundell D., y Jenh C. H. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 5549-57.
- Csordas A. Butyrate, aspirin and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1996; **5**: 221-31.
- Cuff M. A., Lambert D. W., y Shirazi-Beechey S. P. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol* 2002; **539**: 361-71.
- Cha Y. I., y DuBois R. N. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med* 2007; **58**: 239-52.
- Chairoungdua A., Kanai Y., Matsuo H., Inatomi J., Kim D. K., y Endou H. Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain. *J Biol Chem* 2001; **276**: 49390-9.
- Chakraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A., y Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003; **253**: 269-85.
- Chandrasekaran S., Guo N. H., Rodrigues R. G., Kaiser J., y Roberts D. D. Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J Biol Chem* 1999; **274**: 11408-16.
- Chang N. C., Hung S. I., Hwa K. Y., Kato I., Chen J. E., Liu C. H., y Chang A. C. A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *J Biol Chem* 2001; **276**: 17497-506.
- Chen T. H., Chen W. M., Hsu K. H., Kuo C. D., y Hung S. C. Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **355**: 913-8.
- Chillarón J., Roca R., Valencia A., Zorzano A., y Palacín M. Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **281**: F995-1018.
- Cho J. Y., Fox D. A., Horejsi V., Sagawa K., Skubitz K. M., Katz D. R., y Chain B. The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* 2001; **98**: 374-82.
- Cho J. Y., Skubitz K. M., Katz D. R., y Chain B. M. CD98-dependent homotypic aggregation is associated with translocation of protein kinase Cdelta and activation of mitogen-activated protein kinases. *Exp Cell Res* 2003; **286**: 1-11.
- Christensen H. N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 1990; **70**: 43-77.
- Dalton P., Christian H. C., Redman C. W., Sargent I. L., y Boyd C. A. Differential effect of cross-linking the CD98 heavy chain on fusion and amino acid transport in the human placental trophoblast (BeWo) cell line. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1768**: 401-10.
- Daly K., y Shirazi-Beechey S. P. Microarray analysis of butyrate regulated genes in colonic epithelial cells. *DNA Cell Biol* 2006; **25**: 49-62.

- Dashwood R. H., Myzak M. C., y Ho E. Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis* 2006; **27**: 344-9.
- Dauter Z., Dauter M., Brzozowski A. M., Christensen S., Borchert T. V., Beier L., Wilson K. S., y Davies G. J. X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Biochemistry* 1999; **38**: 8385-92.
- Dave M. H., Schulz N., Zecevic M., Wagner C. A., y Verrey F. Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine. *J Physiol* 2004; **558**: 597-610.
- Davido D. J., Richter F., Boxberger F., Stahl A., Menzel T., Luhrs H., Loffler S., Dusel G., Rapp U. R., y Scheppach W. Butyrate and propionate downregulate ERK phosphorylation in HT-29 colon carcinoma cells prior to differentiation. *Eur J Cancer Prev* 2001; **10**: 313-21.
- Davidson B., Givant-Horwitz V., Lazarovici P., Risberg B., Nesland J. M., Trope C. G., Schaefer E., y Reich R. Matrix metalloproteinases (MMP), EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) and mitogen-activated protein kinases (MAPK): co-expression in metastatic serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2003; **20**: 621-31.
- Davie J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 2003; **133**: 2485S-93S.
- de Bono J. S., Kristeleit R., Tolcher A., Fong P., Pacey S., Karavasilis V., Mita M., Shaw H., Workman P., Kaye S., Rowinsky E. K., Aherne W., Atadja P., Scott J. W., y Patnaik A. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of LAQ824, a hydroxamate histone deacetylase inhibitor with a heat shock protein-90 inhibitory profile, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 6663-73.
- De Preter V., Geboes K. P., Bulteel V., Vandermeulen G., Suenart P., Rutgeerts P., y Verbeke K. Kinetics of butyrate metabolism in the normal colon and in ulcerative colitis: the effects of substrate concentration and carnitine on the beta-oxidation pathway. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; **34**: 526-32.
- Degriolamo C., Modica S., Palasciano G., y Moschetta A. Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. *Trends Mol Med* 2011; **17**: 564-72.
- Deves R., y Boyd C. A. Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J Membr Biol* 2000; **173**: 165-77.
- Diaz L. A., Jr., Friedman A. W., He X., Kuick R. D., Hanash S. M., y Fox D. A. Monocyte-dependent regulation of T lymphocyte activation through CD98. *Int Immunol* 1997; **9**: 1221-31.
- Ding Q., Wang Q., y Evers B. M. Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **284**: 282-8.
- Dixon W. T., Sikora L. K., Demetrick D. J., y Jerry L. M. Isolation and characterization of a heterodimeric surface antigen on human melanoma cells and evidence that it is the 4F2 cell activation/proliferation molecule. *Int J Cancer* 1990; **45**: 59-68.
- Domínguez F., Simón C., Quiñonero A., Ramírez M. A., González-Muñoz E., Burghardt H., Cervero A., Martínez S., Pellicer A., Palacín M., Sánchez-Madrid F., y Yáñez-Mo M. Human endometrial CD98 is essential for blastocyst adhesion. *PLoS One* 2010; **5**: e13380.
- Dong S., y Hughes R. C. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J* 1997; **14**: 267-74.
- Essegir S., Reis-Filho J. S., Kennedy A., James M., O'Hare M. J., Jeffery R., Poulson R., y Isacke C. M. Identification of transmembrane proteins as potential prognostic markers and therapeutic targets in breast cancer by a screen for signal sequence encoding transcripts. *J Pathol* 2006; **210**: 420-30.
- Esteban F., Ruiz-Cabello F., Concha A., Pérez Ayala M., Delgado M., y Garrido F. Relationship of 4F2 antigen with local growth and metastatic potential of squamous cell carcinoma of the larynx. *Cancer* 1990; **66**: 1493-8.

- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; **8**: 286-98.
- Estévez R., Camps M., Rojas A. M., Testar X., Deves R., Hediger M. A., Zorzano A., y Palacín M. The amino acid transport system y<sup>+</sup>L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J* 1998; **12**: 1319-29.
- Fassler R., y Meyer M. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 1995; **9**: 1896-908.
- Fearnhead N. S., Wilding J. L., y Bodmer W. F. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull* 2002; **64**: 27-43.
- Fearon E. R., y Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**: 759-67.
- Fenczik C. A., Sethi T., Ramos J. W., Hughes P. E., y Ginsberg M. H. Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature* 1997; **390**: 81-5.
- Fenczik C. A., Zent R., Dellos M., Calderwood D. A., Satriano J., Kelly C., y Ginsberg M. H. Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J Biol Chem* 2001; **276**: 8746-52.
- Feral C. C., Nishiya N., Fenczik C. A., Stuhlmann H., Slepak M., y Ginsberg M. H. CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 355-60.
- Feral C. C., Zijlstra A., Tkachenko E., Prager G., Gardel M. L., Slepak M., y Ginsberg M. H. CD98hc (SLC3A2) participates in fibronectin matrix assembly by mediating integrin signaling. *J Cell Biol* 2007; **178**: 701-11.
- Ferlay J., Parkin D. M., y Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; **46**: 765-81.
- Fernandes T., de Angelo-Andrade L. A., Morais S. S., Pinto G. A., Chagas C. A., Maria-Engler S. S., y Zeferino L. C. Stromal cells play a role in cervical cancer progression mediated by MMP-2 protein. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008; **29**: 341-4.
- Fingleton B. (2008) MMP Inhibitor Clinical Trials- the past, present and future. In: Edwards D. (ed). *The Cancer Degradome: proteases and cancer biology*, Springer Science, New York
- Fodde R., Kuipers J., Rosenberg C., Smits R., Kielman M., Gaspar C., van Es J. H., Breukel C., Wiegant J., Giles R. H., y Clevers H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 433-8.
- Fodde R., Smits R., y Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; **1**: 55-67.
- Fogelstrand P., Feral C. C., Zargham R., y Ginsberg M. H. Dependence of proliferative vascular smooth muscle cells on CD98hc (4F2hc, SLC3A2). *J Exp Med* 2009; **206**: 2397-406.
- Forsyth W. R., Bilsel O., Gu Z., y Matthews C. R. Topology and sequence in the folding of a TIM barrel protein: global analysis highlights partitioning between transient off-pathway and stable on-pathway folding intermediates in the complex folding mechanism of a (betaalpha)<sub>8</sub> barrel of unknown function from *B. subtilis*. *J Mol Biol* 2007; **372**: 236-53.
- Fort J., de la Ballina L. R., Burghardt H. E., Ferrer-Costa C., Turnay J., Ferrer-Orta C., Uson I., Zorzano A., Fernández-Recio J., Orozco M., Lizarbe M. A., Fita I., y Palacín M. The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *J Biol Chem* 2007; **282**: 31444-52.
- Fredstrom S. B., Lampe J. W., Jung H. J., y Slavin J. L. Apparent fiber digestibility and fecal short-chain fatty acid concentrations with ingestion of two types of dietary fiber. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1994; **18**: 14-9.
- Fukasawa Y., Segawa H., Kim J. Y., Chairoungdua A., Kim D. K., Matsuo H., Cha S. H., Endou H., y Kanai Y. Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem* 2000; **275**: 9690-8.

- Fukuda H., Sano N., Muto S., y Horikoshi M. Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006; **5**: 190-208.
- Fulda S. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors and regulation of TRAIL-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2012;
- Furuya M., Horiguchi J., Nakajima H., Kanai Y., y Oyama T. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci* 2012; **103**: 382-9.
- Gabison E. E., Hoang-Xuan T., Mauviel A., y Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 2005; **87**: 361-8.
- Gabrisko M., y Janecek S. Looking for the ancestry of the heavy-chain subunits of heteromeric amino acid transporters rBAT and 4F2hc within the GH13 alpha-amylase family. *FEBS J* 2009; **276**: 7265-78.
- Gasol E., Jimenez-Vidal M., Chillaron J., Zorzano A., y Palacín M. Membrane topology of system xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J Biol Chem* 2004; **279**: 31228-36.
- Geering K. The functional role of the beta-subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase. *FEBS Lett* 1991; **285**: 189-93.
- Gibson P. R., Rosella O., Wilson A. J., Mariadason J. M., Rickard K., Byron K., y Barkla D. H. Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate. *Carcinogenesis* 1999; **20**: 539-44.
- Ginsberg M. H., Partridge A., y Shattil S. J. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 509-16.
- Glaser K. B. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol* 2007; **74**: 659-71.
- Glozak M. A., Sengupta N., Zhang X., y Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005; **363**: 15-23.
- Goldman R., y Shields P. G. Food mutagens. *J Nutr* 2003; **133 Suppl 3**: 965S-73S.
- Goto A., Shomori K., Ohkumo T., Tanaka F., Sato K., y Ito H. Hyperthermia-induced apoptosis occurs both in a p53 gene-dependent and -independent manner in three human gastric carcinoma cell lines. *Oncol Rep* 1999; **6**: 335-9.
- Gottesdiener K. M., Karpinski B. A., Lindsten T., Strominger J. L., Jones N. H., Thompson C. B., y Leiden J. M. Isolation and structural characterization of the human 4F2 heavy-chain gene, an inducible gene involved in T-lymphocyte activation. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 3809-19.
- Gou X. X., Jin F., Chen H. X., Wu W. L., Chen L., y Zeng Y. [Expressions of CD147, MMP-2 and MMP-9 in laryngeal carcinoma and clinical significance]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2010; **90**: 1264-7.
- Gualfetti P. J., Bilsel O., y Matthews C. R. The progressive development of structure and stability during the equilibrium folding of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Protein Sci* 1999; **8**: 1623-35.
- Guilloteau P., Martin L., Eeckhaut V., Ducatelle R., Zabielski R., y Van Immerseel F. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev* 2010; **23**: 366-84.
- Gunter M. J., y Leitzmann M. F. Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *J Nutr Biochem* 2006; **17**: 145-56.
- Guo H., Zucker S., Gordon M. K., Toole B. P., y Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 24-7.
- Guo W., y Giancotti F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 816-26.

- Gutiérrez-López M. D., Ovalle S., Yáñez-Mo M., Sánchez-Sánchez N., Rubinstein E., Olmo N., Lizarbe M. A., Sánchez-Madrid F., y Cabañas C. A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated beta1 integrin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 208-18.
- Hadjiagapiou C., Schmidt L., Dudeja P. K., Layden T. J., y Ramaswamy K. Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **279**: G775-80.
- Haining Z., Kawai N., Miyake K., Okada M., Okubo S., Zhang X., Fei Z., y Tamiya T. Relation of LAT1/4F2hc expression with pathological grade, proliferation and angiogenesis in human gliomas. *BMC Clin Pathol* 2012; **12**: 4.
- Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* 1996; **56**: 5309-18.
- Halili M. A., Andrews M. R., Labzin L. I., Schroder K., Matthias G., Cao C., Lovelace E., Reid R. C., Le G. T., Hume D. A., Irvine K. M., Matthias P., Fairlie D. P., y Sweet M. J. Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol* 2010; **87**: 1103-14.
- Hall M. N., Campos H., Li H., Sesso H. D., Stampfer M. J., Willett W. C., y Ma J. Blood levels of long-chain polyunsaturated fatty acids, aspirin, and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**: 314-21.
- Hamer H. M., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F. J., y Brummer R. J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; **27**: 104-19.
- Hanahan D., y Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57-70.
- Hanahan D., y Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646-74.
- Haner K., Henzi T., Pfefferli M., Kunzli E., Salicio V., y Schwaller B. A bipartite butyrate-responsive element in the human calretinin (CALB2) promoter acts as a repressor in colon carcinoma cells but not in mesothelioma cells. *J Cell Biochem* 2010; **109**: 519-31.
- Hara K., Kudoh H., Enomoto T., Hashimoto Y., y Masuko T. Malignant transformation of NIH3T3 cells by overexpression of early lymphocyte activation antigen CD98. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **262**: 720-5.
- Hardie D. G., Ross F. A., y Hawley S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 251-62.
- Haynes B. F., Hemler M. E., Mann D. L., Eisenbarth G. S., Shelhamer J., Mostowski H. S., Thomas C. A., Strominger J. L., y Fauci A. S. Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J Immunol* 1981; **126**: 1409-14.
- Heath J. P. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int* 1996; **20**: 139-46.
- Helming L., y Gordon S. The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology* 2007; **212**: 785-93.
- Henderson N. C., Collis E. A., Mackinnon A. C., Simpson K. J., Haslett C., Zent R., Ginsberg M., y Sethi T. CD98hc (SLC3A2) interaction with beta 1 integrins is required for transformation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 54731-41.
- Hijova E., y Chmelarova A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy* 2007; **108**: 354-8.
- Hinnebusch B. F., Meng S., Wu J. T., Archer S. Y., y Hodin R. A. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* 2002; **132**: 1012-7.
- Hodin R. A., Meng S., Archer S., y Tang R. Cellular growth state differentially regulates enterocyte gene expression in butyrate-treated HT-29 cells. *Cell Growth Differ* 1996; **7**: 647-53.

- Hofmann A. F. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 1999; **159**: 2647-58.
- Hofmann A. F. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front Biosci* 2009; **14**: 2584-98.
- Hubeek I., Comijn E. M., Van der Wilt C. L., Merriman R. L., Padron J. M., Kaspers G. J., y Peters G. J. CI-994 (N-acetyl-dinaline) in combination with conventional anti-cancer agents is effective against acute myeloid leukemia in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2008; **19**: 1517-23.
- Hughes R. C. Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology* 1994; **4**: 5-12.
- Hughes R. C. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; **83**: 667-76.
- Humphries A., y Wright N. A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 415-24.
- Humphries J. D., Byron A., y Humphries M. J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006; **119**: 3901-3.
- Hursting S. D., Nunez N. P., Varticovski L., y Vinson C. The obesity-cancer link: lessons learned from a fatless mouse. *Cancer Res* 2007; **67**: 2391-3.
- Hynes R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; **110**: 673-87.
- Ikebe T., Shinohara M., Takeuchi H., Beppu M., Kurahara S., Nakamura S., y Shirasuna K. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999; **17**: 315-23.
- Intasai N., Tragoolpua K., Pingmuang P., Khunkaewla P., Moonsom S., Kasinrerak W., Lieber A., y Tayapiwatana C. Potent inhibition of OKT3-induced T cell proliferation and suppression of CD147 cell surface expression in HeLa cells by scFv-M6-1B9. *Immunobiology* 2009;
- Ito Y., Komada H., Kusagawa S., Tsurudome M., Matsumura H., Kawano M., Ohta H., y Nishio M. Fusion regulation proteins on the cell surface: isolation and characterization of monoclonal antibodies which enhance giant polykaryocyte formation in Newcastle disease virus-infected cell lines of human origin. *J Virol* 1992; **66**: 5999-6007.
- Janecek S., Svensson B., y Henrissat B. Domain evolution in the alpha-amylase family. *J Mol Evol* 1997; **45**: 322-31.
- Janson W., Brandner G., y Siegel J. Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53-independent differentiation and apoptosis. *Oncogene* 1997; **15**: 1395-406.
- Jasanoff A., Davis B., y Fersht A. R. Detection of an intermediate in the folding of the (beta alpha)8-barrel N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase from Escherichia coli. *Biochemistry* 1994; **33**: 6350-5.
- Jass J. R. Colorectal cancer: a multipathway disease. *Crit Rev Oncog* 2006; **12**: 273-87.
- Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., y Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; **61**: 69-90.
- Jia L., Wei W., Cao J., Xu H., Miao X., y Zhang J. Silencing CD147 inhibits tumor progression and increases chemosensitivity in murine lymphoid neoplasm P388D1 cells. *Ann Hematol* 2009; **88**: 753-60.
- Jiang J., Tang Y. L., y Liang X. H. EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2011; **11**: 714-23.
- Jin S., y Scotto K. W. Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 4377-84.
- Johnson G. L., y Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; **298**: 1911-2.
- Johnson I. T., y Lund E. K. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; **26**: 161-81.

- Jung J. W., Cho S. D., Ahn N. S., Yang S. R., Park J. S., Jo E. H., Hwang J. W., Jung J. Y., Kim S. H., Kang K. S., y Lee Y. S. Ras/MAP kinase pathways are involved in Ras specific apoptosis induced by sodium butyrate. *Cancer Lett* 2005; **225**: 199-206.
- Kabir-Salmani M., Fukuda M. N., Kanai-Azuma M., Ahmed N., Shiokawa S., Akimoto Y., Sakai K., Nagamori S., Kanai Y., Sugihara K., y Iwashita M. The membrane-spanning domain of CD98 heavy chain promotes  $\alpha(v)\beta3$  integrin signals in human extravillous trophoblasts. *Mol Endocrinol* 2008; **22**: 707-15.
- Kaira K., Ohde Y., Endo M., Nakagawa K., Okumura T., Takahashi T., Murakami H., Tsuya A., Nakamura Y., Naito T., Kondo H., Nakajima T., y Yamamoto N. Expression of 4F2hc (CD98) in pulmonary neuroendocrine tumors. *Oncol Rep* 2011; **26**: 931-7.
- Kaira K., Oriuchi N., Imai H., Shimizu K., Yanagitani N., Sunaga N., Hisada T., Kawashima O., Kamide Y., Ishizuka T., Kanai Y., Nakajima T., y Mori M. CD98 expression is associated with poor prognosis in resected non-small-cell lung cancer with lymph node metastases. *Ann Surg Oncol* 2009; **16**: 3473-81.
- Kaira K., Oriuchi N., Imai H., Shimizu K., Yanagitani N., Sunaga N., Hisada T., Tanaka S., Ishizuka T., Kanai Y., Endou H., Nakajima T., y Mori M. L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci* 2008; **99**: 2380-6.
- Kaira K., Oriuchi N., Takahashi T., Nakagawa K., Ohde Y., Okumura T., Murakami H., Shukuya T., Kenmotsu H., Naito T., Kanai Y., Endo M., Kondo H., Nakajima T., y Yamamoto N. LAT1 expression is closely associated with hypoxic markers and mTOR in resected non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res* 2011; **3**: 468-78.
- Kaji M., Kabir-Salmani M., Anzai N., Jin C. J., Akimoto Y., Horita A., Sakamoto A., Kanai Y., Sakurai H., y Iwashita M. Properties of L-type amino acid transporter 1 in epidermal ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2010; **20**: 329-36.
- Kanai Y., Segawa H., Miyamoto K., Uchino H., Takeda E., y Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 1998; **273**: 23629-32.
- Karpinski B. A., Yang L. H., Cacheris P., Morle G. D., y Leiden J. M. The first intron of the 4F2 heavy-chain gene contains a transcriptional enhancer element that binds multiple nuclear proteins. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 2588-97.
- Kenny H. A., Kaur S., Coussens L. M., y Lengyel E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest* 2008; **118**: 1367-79.
- Khwaja A., Rodriguez-Viciana P., Wennstrom S., Warne P. H., y Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* 1997; **16**: 2783-93.
- Kim H. J., y Bae S. C. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res* 2011; **3**: 166-79.
- Kim S. H., Kim K. W., y Jeong J. W. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, through hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  suppression. *Oncol Rep* 2007; **17**: 793-7.
- Kim S. M., y Hahn J. H. CD98 activation increases surface expression and clustering of  $\beta1$  integrins in MCF-7 cells through FAK/Src- and cytoskeleton-independent mechanisms. *Exp Mol Med* 2008; **40**: 261-70.
- Kim Y. J., y Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J* 1997; **14**: 569-76.
- Kirk P., Wilson M. C., Heddle C., Brown M. H., Barclay A. N., y Halestrap A. P. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 2000; **19**: 3896-904.



- Kodate M., Kasai T., Hashimoto H., Yasumoto K., Iwata Y., y Manabe H. Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 1997; **47**: 461-9.
- Kolesnikova T. V., Mannion B. A., Berditchevski F., y Hemler M. E. Beta1 integrins show specific association with CD98 protein in low density membranes. *BMC Biochem* 2001; **2**: 10.
- Kucharzik T., Lugering A., Yan Y., Driss A., Charrier L., Sitaraman S., y Merlin D. Activation of epithelial CD98 glycoprotein perpetuates colonic inflammation. *Lab Invest* 2005; **85**: 932-41.
- Kuniyasu H., Ellis L. M., Evans D. B., Abbruzzese J. L., Fenoglio C. J., Bucana C. D., Cleary K. R., Tahara E., y Fidler I. J. Relative expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts disease outcome in patients with resectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 25-33.
- Kuntz S., Kunz C., y Rudloff S. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *Br J Nutr* 2009; **101**: 1306-15.
- Kuwajima K. The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* 1989; **6**: 87-103.
- Lachenmayer A., Toffanin S., Cabellos L., Alsinet C., Hoshida Y., Villanueva A., Minguez B., Tsai H. W., Ward S. C., Thung S., Friedman S. L., y Llovet J. M. Combination therapy for hepatocellular carcinoma: Additive preclinical efficacy of the HDAC inhibitor panobinostat with sorafenib. *J Hepatol* 2012;
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-5.
- Laherty C. D., Yang W. M., Sun J. M., Davie J. R., Seto E., y Eisenman R. N. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 1997; **89**: 349-56.
- Lakowicz J. R. (1999) Quenching of fluorescence. In: Lakowicz J. R. (ed). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Larue L., y Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005; **24**: 7443-54.
- Lazarova D. L., Bordonaro M., Carbone R., y Sartorelli A. C. Linear relationship between Wnt activity levels and apoptosis in colorectal carcinoma cells exposed to butyrate. *Int J Cancer* 2004; **110**: 523-31.
- Lecona E., Barrasa J. I., Olmo N., Llorente B., Turnay J., y Lizarbe M. A. Upregulation of annexin A1 expression by butyrate in human colon adenocarcinoma cells: role of p53, NF- $\kappa$ B, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 4665-74.
- Lefebvre P., Cariou B., Lien F., Kuipers F., y Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009; **89**: 147-91.
- Leiden J. M., Yang L. H., Morle G. D., June C. H., Lindsten T., Thompson C. B., y Karpinski B. The 4F2 heavy chain gene: a molecular model of inducible gene expression in human T cells. *J Autoimmun* 1989; **2 Suppl**: 67-79.
- Lemaitre G., Gonnet F., Vaigot P., Gidrol X., Martin M. T., Tortajada J., y Waksman G. CD98, a novel marker of transient amplifying human keratinocytes. *Proteomics* 2005; **5**: 3637-45.
- Leschelle X., Delpal S., Goubert M., Blottiere H. M., y Blachier F. Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-CoA synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 6435-42.
- Li Q. Q., Wang W. J., Xu G. P., Cao X. X., Xu J. D., Chen Q., Tang F., y Xu Z. D. [CD147 and matrix metallo-proteinase (MMP) 2 and MMP9 expression in multidrug resistant breast cancer cells treated with P-glycoprotein substrate drugs]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2007; **36**: 247-52.

- Li Q. Q., Wang W. J., Xu J. D., Cao X. X., Chen Q., Yang J. M., y Xu Z. D. Involvement of CD147 in regulation of multidrug resistance to P-gp substrate drugs and in vitro invasion in breast cancer cells. *Cancer Sci* 2007; **98**: 1064-9.
- Li R., Huang L., Guo H., y Toole B. P. Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts. *J Cell Physiol* 2001; **186**: 371-9.
- Li S., Chien S., y Branemark P. I. Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts. *J Orthop Res* 1999; **17**: 891-9.
- Lian G., Arimochi H., Kitamura A., Nishida J., Li S., Kishihara K., Maekawa Y., y Yasutomo K. Manipulation of CD98 resolves type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2012; **188**: 2227-34.
- Libra M., Scalisi A., Vella N., Clementi S., Sorio R., Stivala F., Spandidos D. A., y Mazzarino C. Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). *Int J Oncol* 2009; **34**: 897-903.
- Lim S. J., Choi M. K., Kim M. J., y Lee C. H. Effect of butyrate on the heregulin/ErbB-mediated proliferation of human colorectal cancer cells. *Mol Med Report* 2009; **2**: 497-502.
- Lin H. Y., Chen C. S., Lin S. P., y Weng J. R. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev* 2006; **26**: 397-413.
- Lindsten T., June C. H., Thompson C. B., y Leiden J. M. Regulation of 4F2 heavy-chain gene expression during normal human T-cell activation can be mediated by multiple distinct molecular mechanisms. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 3820-6.
- Liu C., Li Y., Semenov M., Han C., Baeg G. H., Tan Y., Zhang Z., Lin X., y He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; **108**: 837-47.
- Liu S., Thomas S. M., Woodside D. G., Rose D. M., Kiosses W. B., Pfaff M., y Ginsberg M. H. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* 1999; **402**: 676-81.
- Longpre J. M., y Loo G. Protection of human colon epithelial cells against deoxycholate by rottlerin. *Apoptosis* 2008; **13**: 1162-71.
- López-Conejo M. T., Olmo N., Turnay J., López de Silanes I., y Lizarbe M. A. Interaction of fibronectin with human colon adenocarcinoma cells: effect on the in vivo tumorigenic capacity. *Oncology* 2002; **62**: 371-80.
- López-Conejo T., Olmo N., Turnay J., Navarro J., y Lizarbe A. Characterization of tumorigenic sub-lines from a poorly tumorigenic human colon-adenocarcinoma cell line. *Int J Cancer* 1996; **67**: 668-75.
- López de Silanes I., Olmo N., Turnay J., González de Buitrago G., Pérez-Ramos P., Guzmán-Aránguez A., García-Díez M., Lecona E., Gorospe M., y Lizarbe M. A. Acquisition of resistance to butyrate enhances survival after stress and induces malignancy of human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 4593-600.
- Ludwig T. Local proteolytic activity in tumor cell invasion and metastasis. *Bioessays* 2005; **27**: 1181-91.
- Lumadue J. A., Glick A. B., y Ruddle F. H. Cloning, sequence analysis, and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 9204-8.
- Luo B. H., Carman C. V., y Springer T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 619-47.
- Ma K., Saha P. K., Chan L., y Moore D. D. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1102-9.
- MacGregor E. A., Janecek S., y Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1546**: 1-20.

- Mackay H. J., Hirte H., Colgan T., Covens A., MacAlpine K., Greci P., Wang L., Mason J., Pham P. A., Tsao M. S., Pan J., Zwiebel J., y Oza A. M. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in women with platinum resistant epithelial ovarian cancer and micropapillary (LMP) ovarian tumours. *Eur J Cancer* 2010; **46**: 1573-9.
- Maeta H., Ohgi S., y Terada T. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 2001; **438**: 121-8.
- Mandl-Weber S., Meinel F. G., Jankowsky R., Oduncu F., Schmidmaier R., y Baumann P. The novel inhibitor of histone deacetylase resminostat (RAS2410) inhibits proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *Br J Haematol* 2010; **149**: 518-28.
- Mariadason J. M., Corner G. A., y Augenlicht L. H. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res* 2000; **60**: 4561-72.
- Marieb E. A., Zoltan-Jones A., Li R., Misra S., Ghatak S., Cao J., Zucker S., y Toole B. P. Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production. *Cancer Res* 2004; **64**: 1229-32.
- Markowitz S. D., y Bertagnolli M. M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; **361**: 2449-60.
- Marks P. A. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; **19**: 1049-66.
- Marks P. A., y Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 2007; **25**: 84-90.
- Marks P. A., y Xu W. S. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 2009; **107**: 600-8.
- Mastroberardino L., Spindler B., Pfeiffer R., Skelly P. J., Loffing J., Shoemaker C. B., y Verrey F. Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 1998; **395**: 288-91.
- Matsuo H., Kanai Y., Kim J. Y., Chairoungdua A., Kim D. K., Inatomi J., Shigeta Y., Ishimine H., Chaekuntode S., Tachampa K., Choi H. W., Babu E., Fukuda J., y Endou H. Identification of a novel Na<sup>+</sup>-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. *J Biol Chem* 2002; **277**: 21017-26.
- McIntosh G. H. Colon cancer: dietary modifications required for a balanced protective diet. *Prev Med* 1993; **22**: 767-74.
- Melchior A., Denys A., Deligny A., Mazurier J., y Allain F. Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C-delta and p44/42 mitogen-activated protein kinases. *Exp Cell Res* 2008; **314**: 616-28.
- Merlin D., Sitaraman S., Liu X., Eastburn K., Sun J., Kucharzik T., Lewis B., y Madara J. L. CD98-mediated links between amino acid transport and beta 1 integrin distribution in polarized columnar epithelia. *J Biol Chem* 2001; **276**: 39282-9.
- Miki K., Unno N., Nagata T., Uchijima M., Konno H., Koide Y., y Nakamura S. Butyrate suppresses hypoxia-inducible factor-1 activity in intestinal epithelial cells under hypoxic conditions. *Shock* 2004; **22**: 446-52.
- Miller S. J. Cellular and physiological effects of short-chain fatty acids. *Mini Rev Med Chem* 2004; **4**: 839-45.
- Minamoto T., Mai M., y Ronai Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1999; **20**: 519-27.
- Miranti C. K., y Brugge J. S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: E83-90.

- Mitra S. K., Hanson D. A., y Schlaepfer D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 56-68.
- Miyake J. H., Wang S. L., y Davis R. A. Bile acid induction of cytokine expression by macrophages correlates with repression of hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 21805-8.
- Miyamoto Y. J., Mitchell J. S., y McIntyre B. W. Physical association and functional interaction between beta1 integrin and CD98 on human T lymphocytes. *Mol Immunol* 2003; **39**: 739-51.
- Miyauchi S., Gopal E., Fei Y. J., y Ganapathy V. Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem* 2004; **279**: 13293-6.
- Mori K., Nishimura M., Tsurudome M., Ito M., Nishio M., Kawano M., Kozuka Y., Yamashita Y., Komada H., Uchida A., y Ito Y. The functional interaction between CD98 and CD147 in regulation of virus-induced cell fusion and osteoclast formation. *Med Microbiol Immunol* 2004; **193**: 155-62.
- Morozevich G., Kozlova N., Cheglakov I., Ushakova N., y Berman A. Integrin alpha5beta1 controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity. *Cell Cycle* 2009; **8**: 2219-25.
- Munster P., Marchion D., Bicaku E., Lacevic M., Kim J., Centeno B., Daud A., Neuger A., Minton S., y Sullivan D. Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 2488-96.
- Muramatsu T., y Miyauchi T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* 2003; **18**: 981-7.
- Nakamura E., Sato M., Yang H., Miyagawa F., Harasaki M., Tomita K., Matsuoka S., Noma A., Iwai K., y Minato N. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 1999; **274**: 3009-16.
- Navarro J. M., Olmo N., Turnay J., Lopez-Conejo M. T., y Lizarbe M. A. Differentiation of BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells by sodium butyrate: increase in 5'-nucleotidase activity. *Eur J Clin Invest* 1997; **27**: 620-8.
- Nguyen H. T., Dalmaso G., Yan Y., Laroui H., Dahan S., Mayer L., Sitaraman S. V., y Merlin D. MicroRNA-7 modulates CD98 expression during intestinal epithelial cell differentiation. *J Biol Chem* 2010; **285**: 1479-89.
- Nguyen H. T., Dalmaso G., Yan Y., Obertone T. S., Sitaraman S. V., y Merlin D. Ectophosphorylation of CD98 regulates cell-cell interactions. *PLoS One* 2008; **3**: e3895.
- Nicklin P., Bergman P., Zhang B., Triantafellow E., Wang H., Nyfeler B., Yang H., Hild M., Kung C., Wilson C., Myer V. E., MacKeigan J. P., Porter J. A., Wang Y. K., Cantley L. C., Finan P. M., y Murphy L. O. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 2009; **136**: 521-34.
- Ochieng J., Green B., Evans S., James O., y Warfield P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1379**: 97-106.
- Ohgimoto S., Tabata N., Suga S., Nishio M., Ohta H., Tsurudome M., Komada H., Kawano M., Watanabe N., y Ito Y. Molecular characterization of fusion regulatory protein-1 (FRP-1) that induces multinucleated giant cell formation of monocytes and HIV gp160-mediated cell fusion. FRP-1 and 4F2/CD98 are identical molecules. *J Immunol* 1995; **155**: 3585-92.
- Ohta H., Tsurudome M., Matsumura H., Koga Y., Morikawa S., Kawano M., Kusugawa S., Komada H., Nishio M., y Ito Y. Molecular and biological characterization of fusion regulatory proteins (FRPs): anti-FRP mAbs induced HIV-mediated cell fusion via an integrin system. *EMBO J* 1994; **13**: 2044-55.

- Okamoto K., Tsurudome M., Ohgimoto S., Kawano M., Nishio M., Komada H., Ito M., Sakakura Y., y Ito Y. An anti-fusion regulatory protein-1 monoclonal antibody suppresses human parainfluenza virus type 2-induced cell fusion. *J Gen Virol* 1997; **78** ( Pt 1): 83-9.
- Olmo N., Turnay J., Lecona E., García-Díez M., Llorente B., Santiago-Gómez A., y Lizarbe M. A. Acquisition of resistance to butyrate induces resistance to luminal components and other types of stress in human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 2007; **21**: 254-61.
- Olmo N., Turnay J., Pérez-Ramos P., Lecona E., Barrasa J. I., López de Silanes I., y Lizarbe M. A. In vitro models for the study of the effect of butyrate on human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 2007; **21**: 262-70.
- Oppenheimer G. M. Paradigm lost: race, ethnicity, and the search for a new population taxonomy. *Am J Public Health* 2001; **91**: 1049-55.
- Ovalle S., Gutiérrez-López M. D., Olmo N., Turnay J., Lizarbe M. A., Majano P., Molina-Jiménez F., López-Cabrera M., Yáñez-Mo M., Sánchez-Madrid F., y Cabañas C. The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2007; **121**: 2140-52.
- Overall C. M., y Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 657-72.
- Pace B. S., Chen Y. R., Thompson A., y Goodman S. R. Butyrate-inducible elements in the human gamma-globin promoter. *Exp Hematol* 2000; **28**: 283-93.
- Pal D., Banerjee S., y Ghosh A. K. Dietary-induced cancer prevention: An expanding research arena of emerging diet related to healthcare system. *J Adv Pharm Technol Res* 2012; **3**: 16-24.
- Palacín M. A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of a transport function. *J Exp Biol* 1994; **196**: 123-37.
- Palacín M., Estévez R., Bertran J., y Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 1998; **78**: 969-1054.
- Palacín M., Nunes V., Font-Llitjos M., Jiménez-Vidal M., Fort J., Gasol E., Pineda M., Feliubadalo L., Chillarón J., y Zorzano A. The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology (Bethesda)* 2005; **20**: 112-24.
- Pan Y., He B., Song G., Bao Q., Tang Z., Tian F., y Wang S. CD147 silencing via RNA interference reduces tumor cell invasion, metastasis and increases chemosensitivity in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 2012;
- Patra S. K. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1785**: 182-206.
- Pearson J. R., Gill C. I., y Rowland I. R. Diet, fecal water, and colon cancer--development of a biomarker. *Nutr Rev* 2009; **67**: 509-26.
- Pérez M. J., y Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 1677-89.
- Pfeiffer R., Spindler B., Loffing J., Skelly P. J., Shoemaker C. B., y Verrey F. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 1998; **439**: 157-62.
- Piao S., Zhao S., Guo F., Xue J., Yao G., Wei Z., Huang Q., Sun Y., y Zhang B. Increased expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of salivary duct carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; **138**: 627-35.
- Piekarz R. L., Frye R., Turner M., Wright J. J., Allen S. L., Kirschbaum M. H., Zain J., Prince H. M., Leonard J. P., Geskin L. J., Reeder C., Joske D., Figg W. D., Gardner E. R., Steinberg S. M., Jaffe E. S., Stetler-Stevenson M., Lade S., Fojo A. T., y Bates S. E. Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5410-7.

- Pouyssegur J., Dayan F., y Mazure N. M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006; **441**: 437-43.
- Powlesland A. S., Hitchen P. G., Parry S., Graham S. A., Barrio M. M., Elola M. T., Mordoh J., Dell A., Drickamer K., y Taylor M. E. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiology* 2009; **19**: 899-909.
- Prager G. W., Poettler M., Schmidinger M., Mazal P. R., Susani M., Zielinski C. C., y Haitel A. CD98hc (SLC3A2), a novel marker in renal cell cancer. *Eur J Clin Invest* 2009; **39**: 304-10.
- Ptitsyn O. B. Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem* 1995; **47**: 83-229.
- Purrucker J. C., Fricke A., Ong M. F., Rube C., Rube C. E., y Mahlknecht U. HDAC inhibition radiosensitizes human normal tissue cells and reduces DNA Double-Strand Break repair capacity. *Oncol Rep* 2010; **23**: 263-9.
- Quackenbush E., Clabby M., Gottesdiener K. M., Barbosa J., Jones N. H., Strominger J. L., Speck S., y Leiden J. M. Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2 cell-surface antigen: a type II membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 6526-30.
- Radisky E. S., y Radisky D. C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; **15**: 201-12.
- Radtke F., y Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 2005; **307**: 1904-9.
- Radtke F., Clevers H., y Riccio O. From gut homeostasis to cancer. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 275-89.
- Rajan D. P., Kekuda R., Huang W., Wang H., Devoe L. D., Leibach F. H., Prasad P. D., y Ganapathy V. Cloning and expression of a b(0,+)-like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rBAT. A new candidate gene for cystinuria. *J Biol Chem* 1999; **274**: 29005-10.
- Reynolds B., Roversi P., Laynes R., Kazi S., Boyd C. A., y Goberdhan D. C. Drosophila expresses a CD98 transporter with an evolutionarily conserved structure and amino acid-transport properties. *Biochem J* 2009; **420**: 363-72.
- Ridlon J. M., Kang D. J., y Hylemon P. B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006; **47**: 241-59.
- Rikiishi H. Autophagic and apoptotic effects of HDAC inhibitors on cancer cells. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 830260.
- Rintoul R. C., Buttery R. C., Mackinnon A. C., Wong W. S., Mosher D., Haslett C., y Sethi T. Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 2841-52.
- Roediger W. E. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 1982; **83**: 424-9.
- Roomi M. W., Monterrey J. C., Kalinovsky T., Rath M., y Niedzwiecki A. In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *Oncol Rep* 2010; **23**: 605-14.
- Rossier G., Meier C., Bauch C., Summa V., Sordat B., Verrey F., y Kuhn L. C. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34948-54.
- Roy S., Packman K., Jeffrey R., y Tenniswood M. Histone deacetylase inhibitors differentially stabilize acetylated p53 and induce cell cycle arrest or apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 2005; **12**: 482-91.
- Saito A., Yamashita T., Mariko Y., Nosaka Y., Tsuchiya K., Ando T., Suzuki T., Tsuruo T., y Nakanishi O. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 4592-7.

- Sánchez del Pino M. M., y Fersht A. R. Nonsequential unfolding of the alpha/beta barrel protein indole-3-glycerol-phosphate synthase. *Biochemistry* 1997; **36**: 5560-5.
- Sancho E., Batlle E., y Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; **20**: 695-723.
- Sarkar D. HDAC inhibitors and ionizing radiation: combinatorial strategy to combat lung cancer. *Cancer Biol Ther* 2009; **8**: 832-4.
- Sato H., Tamba M., Ishii T., y Bannai S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem* 1999; **274**: 11455-8.
- Sato Y., Heimeier R. A., Li C., Deng C., y Shi Y. B. Extracellular domain of CD98hc is required for early murine development. *Cell Biosci* 2011; **1**: 7.
- Scheppach W., Bartram H. P., y Richter F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; **31A**: 1077-80.
- Schmalfeldt B., Prechtel D., Harting K., Spathe K., Rutke S., Konik E., Fridman R., Berger U., Schmitt M., Kuhn W., y Lengyel E. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 2396-404.
- Schroy P. C., Rustgi A. K., Ikonomu E., Liu X. P., Polito J., Andry C., y O'Keane J. C. Growth and intestinal differentiation are independently regulated in HT29 colon cancer cells. *J Cell Physiol* 1994; **161**: 111-23.
- Semenza G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 721-32.
- Shah P., Nankova B. B., Parab S., y La Gamma E. F. Short chain fatty acids induce TH gene expression via ERK-dependent phosphorylation of CREB protein. *Brain Res* 2006; **1107**: 13-23.
- Sheikh-Hamad D., y Gustin M. C. MAP kinases and the adaptive response to hypertonicity: functional preservation from yeast to mammals. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**: F1102-10.
- Shimamoto Y., Sumizawa T., Haraguchi M., Gotanda T., Jueng H. C., Furukawa T., Sakata R., y Akiyama S. Direct activation of the human major vault protein gene by DNA-damaging agents. *Oncol Rep* 2006; **15**: 645-52.
- Shishido T., Uno S., Kamohara M., Tsuneoka-Suzuki T., Hashimoto Y., Enomoto T., y Masuko T. Transformation of BALB3T3 cells caused by over-expression of rat CD98 heavy chain (HC) requires its association with light chain: mis-sense mutation in a cysteine residue of CD98HC eliminates its transforming activity. *Int J Cancer* 2000; **87**: 311-6.
- Soucek K., Gajduskova P., Brazdova M., Hyzd'alova M., Koci L., Vydra D., Trojanec R., Pernicova Z., Lentvorska L., Hajduch M., Hofmanova J., y Kozubik A. Fetal colon cell line FHC exhibits tumorigenic phenotype, complex karyotype, and TP53 gene mutation. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; **197**: 107-16.
- Stadler J., Stern H. S., Yeung K. S., McGuire V., Furrer R., Marcon N., y Bruce W. R. Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids. *Gut* 1988; **29**: 1326-31.
- Stein J., Zores M., y Schroder O. Short-chain fatty acid (SCFA) uptake into Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier mediated transport mechanism. *Eur J Nutr* 2000; **39**: 121-5.
- Sternlicht M. D., y Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 463-516.
- Stetler-Stevenson W. G., Hewitt R., y Corcoran M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. *Semin Cancer Biol* 1996; **7**: 147-54.
- Subramanian C., Opipari A. W., Jr., Bian X., Castle V. P., y Kwok R. P. Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 4842-7.

- Sun J., y Hemler M. E. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 2001; **61**: 2276-81.
- Sutandyo N. Nutritional carcinogenesis. *Acta Med Indones* 2010; **42**: 36-42.
- Svensson M., Jonasson P., Freskgard P. O., Jonsson B. H., Lindgren M., Martensson L. G., Gentile M., Boren K., y Carlsson U. Mapping the folding intermediate of human carbonic anhydrase II. Probing substructure by chemical reactivity and spin and fluorescence labeling of engineered cysteine residues. *Biochemistry* 1995; **34**: 8606-20.
- Tan J., Cang S., Ma Y., Petrillo R. L., y Liu D. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* 2010; **3**: 5.
- Tanaka T., Masuko T., y Hashimoto Y. Appearance of a proliferation-associated antigen, gp125, on rat and human lymphocytes by co-stimulation with phorbol ester and calcium ionophore. *J Biochem* 1988; **103**: 644-9.
- Tang W., Chang S. B., y Hemler M. E. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 4043-50.
- Tang Y., Nakada M. T., Kesavan P., McCabe F., Millar H., Rafferty P., Bugelski P., y Yan L. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2005; **65**: 3193-9.
- Tang Y., Nakada M. T., Rafferty P., Laraio J., McCabe F. L., Millar H., Cunningham M., Snyder L. A., Bugelski P., y Yan L. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt signaling pathway. *Mol Cancer Res* 2006; **4**: 371-7.
- Teixeira S., Di Grandi S., y Kuhn L. C. Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH2 terminus. *J Biol Chem* 1987; **262**: 9574-80.
- Terzic J., Grivennikov S., Karin E., y Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010; **138**: 2101-14 e5.
- Thomas C., Gioiello A., Noriega L., Strehle A., Oury J., Rizzo G., Macchiarulo A., Yamamoto H., Matak C., Pruzanski M., Pellicciari R., Auwerx J., y Schoonjans K. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 2009; **10**: 167-77.
- Tong C., Yin Z., Song Z., Dockendorff A., Huang C., Mariadason J., Flavell R. A., Davis R. J., Augenlicht L. H., y Yang W. c-Jun NH2-terminal kinase 1 plays a critical role in intestinal homeostasis and tumor suppression. *Am J Pathol* 2007; **171**: 297-303.
- Toole B. P. Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. *Curr Top Dev Biol* 2003; **54**: 371-89.
- Topping D. L., y Clifton P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001; **81**: 1031-64.
- Torrents D., Estévez R., Pineda M., Fernández E., Lloberas J., Shi Y. B., Zorzano A., y Palacín M. Identification and characterization of a membrane protein (y+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y+L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem* 1998; **273**: 32437-45.
- Torrents D., Mykkanen J., Pineda M., Feliubadalo L., Estévez R., de Cid R., Sanjurjo P., Zorzano A., Nunes V., Huoponen K., Reinikainen A., Simell O., Savontaus M. L., Aula P., y Palacín M. Identification of SLC7A7, encoding y+LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet* 1999; **21**: 293-6.
- Tournier C., Hess P., Yang D. D., Xu J., Turner T. K., Nimnual A., Bar-Sagi D., Jones S. N., Flavell R. A., y Davis R. J. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; **288**: 870-4.



- Towbin H., Staehelin T., y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 4350-4.
- Tsai M. L., Liaw S. H., y Chang N. C. The crystal structure of Ym1 at 1.31 Å resolution. *J Struct Biol* 2004; **148**: 290-6.
- Tsumura H., Suzuki N., Saito H., Kawano M., Otake S., Kozuka Y., Komada H., Tsurudome M., y Ito Y. The targeted disruption of the CD98 gene results in embryonic lethality. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **308**: 847-51.
- Tsurudome M., y Ito Y. Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells. *Crit Rev Immunol* 2000; **20**: 167-96.
- Turnay J., Fort J., Olmo N., Santiago-Gómez A., Palacín M., y Lizarbe M. A. Structural characterization and unfolding mechanism of human 4F2hc ectodomain. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1814**: 536-44.
- Turnay J., Olmo N., Gavilanes J. G., Benítez J., y Lizarbe M. A. Establishment and characterization of a new human colon adenocarcinoma cell line: BCS-TC2. *Cytotechnology* 1990; **3**: 75-88.
- Vadrevu R., Wu Y., y Matthews C. R. NMR analysis of partially folded states and persistent structure in the alpha subunit of tryptophan synthase: implications for the equilibrium folding mechanism of a 29-kDa TIM barrel protein. *J Mol Biol* 2008; **377**: 294-306.
- van der Flier L. G., y Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009; **71**: 241-60.
- Verin A. D., Liu F., Bogatcheva N., Borbiev T., Hershenson M. B., Wang P., y Garcia J. G. Role of ras-dependent ERK activation in phorbol ester-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; **279**: L360-70.
- Verrey F., Closs E. I., Wagner C. A., Palacín M., Endou H., y Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 2004; **447**: 532-42.
- Verrey F., Jack D. L., Paulsen I. T., Saier M. H., Jr., y Pfeiffer R. New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membr Biol* 1999; **172**: 181-92.
- Verrey F., Meier C., Rossier G., y Kuhn L. C. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 2000; **440**: 503-12.
- Vihinen P., y Kahari V. M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002; **99**: 157-66.
- Vogelstein B., y Kinzler K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; **10**: 789-99.
- Warrell R. P., Jr., He L. Z., Richon V., Calleja E., y Pandolfi P. P. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1621-5.
- Watanabe K., Hata Y., Kizaki H., Katsube Y., y Suzuki Y. The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J Mol Biol* 1997; **269**: 142-53.
- Weaver V. M., Petersen O. W., Wang F., Larabell C. A., Briand P., Damsky C., y Bissell M. J. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 1997; **137**: 231-45.
- Wei Y. Q., Zhao X., Kariya Y., Teshigawara K., y Uchida A. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1995; **40**: 73-8.
- Weisburger J. H., Reddy B. S., Rose D. P., Cohen L. A., Kendall M. E., y Wynder E. L. Protective mechanisms of dietary fibers in nutritional carcinogenesis. *Basic Life Sci* 1993; **61**: 45-63.

- Wells R. G., y Hediger M. A. Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 5596-600.
- Westermarck J., y Kahari V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; **13**: 781-92.
- Wiegand G., Epp O., y Huber R. The crystal structure of porcine pancreatic alpha-amylase in complex with the microbial inhibitor Tendamistat. *J Mol Biol* 1995; **247**: 99-110.
- Williams E. A., Coxhead J. M., y Mathers J. C. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2003; **62**: 107-15.
- Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc* 2008; **67**: 253-6.
- Witt O., Sand K., y Pekrun A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood* 2000; **95**: 2391-6.
- Wong J. J., Hawkins N. J., y Ward R. L. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut* 2007; **56**: 140-8.
- Xu D., y Hemler M. E. Metabolic activation-related CD147-CD98 complex. *Mol Cell Proteomics* 2005; **4**: 1061-71.
- Xu W. S., Parmigiani R. B., y Marks P. A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007; **26**: 5541-52.
- Yan C., y Boyd D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007; **211**: 19-26.
- Yan Y., Dalmasso G., Sitaraman S., y Merlin D. Characterization of the human intestinal CD98 promoter and its regulation by interferon-gamma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; **292**: G535-45.
- Yan Y., Vasudevan S., Nguyen H., Bork U., Sitaraman S., y Merlin D. Extracellular interaction between hCD98 and the PDZ class II domain of hCASK in intestinal epithelia. *J Membr Biol* 2007; **215**: 15-26.
- Yang H., Zou W., Li Y., Chen B., y Xin X. Bridge linkage role played by CD98hc of anti-tumor drug resistance and cancer metastasis on cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2007; **6**: 942-7.
- Yang J. M., Xu Z., Wu H., Zhu H., Wu X., y Hait W. N. Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer Res* 2003; **1**: 420-7.
- Yang R. Y., Rabinovich G. A., y Liu F. T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008; **10**: e17.
- Yoon J. H., Kim Y. B., Kanai Y., Endou H., y Kim D. K. Sequential increases in 4F2hc expression during DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Anticancer Res* 2003; **23**: 3877-81.
- Yuan L., Yu Y., Sanders M. A., Majumdar A. P., y Basson M. D. Schlafen 3 induction by cyclic strain regulates intestinal epithelial differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; **298**: G994-G1003.
- Zent R., Fenczik C. A., Calderwood D. A., Liu S., Dellos M., y Ginsberg M. H. Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 2000; **275**: 5059-64.
- Zhang Y., Zhou L., Bao Y. L., Wu Y., Yu C. L., Huang Y. X., Sun Y., Zheng L. H., y Li Y. X. Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chem Biol Interact* 2010; **185**: 174-81.

- Zhao J. H., Luo Y., Jiang Y. G., He D. L., y Wu C. T. Knockdown of beta-Catenin through shRNA cause a reversal of EMT and metastatic phenotypes induced by HIF-1alpha. *Cancer Invest* 2011; **29**: 377-82.
- Zhou B. P., Deng J., Xia W., Xu J., Li Y. M., Gunduz M., y Hung M. C. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 931-40.
- Zhou Q., Atadja P., y Davidson N. E. Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation. *Cancer Biol Ther* 2007; **6**: 64-9.
- Zou J. X., Liu Y., Pasquale E. B., y Ruoslahti E. Activated SRC oncogene phosphorylates R-ras and suppresses integrin activity. *J Biol Chem* 2002; **277**: 1824-7.

## 8. Anexo

# Acquisition of resistance to butyrate induces resistance to luminal components and other types of stress in human colon adenocarcinoma cells

N. Olmo, J. Turnay, E. Lecona, M. García-Díez, B. Llorente,  
A. Santiago-Gómez, M.A. Lizarbe \*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

Received 31 March 2006; accepted 14 September 2006

Available online 29 September 2006

## Abstract

Butyrate, naturally produced by anaerobic fermentation of diet-fiber, is the major nutrient of colonocytes and also an important regulator of colonic epithelium renewal and physiology. Other luminal components, such as bile acids or bacterial products, influence these processes. The model system we used to analyze the influence of several luminal stressors is composed of a previously established cell line resistant to the apoptotic effects of butyrate and their parental butyrate-sensitive cells. Viability of butyrate-resistant cells is unaffected by mild heat-shock (2 h, 42 °C) and only slightly reduced by severe heat-shock (2 h, 45 °C) in contrast to their butyrate-sensitive counterparts. The higher constitutive expression of HSP70 and HSP60 could contribute to this resistance. In addition, expression of HSP70 follows a different pattern after heat-shock in both cell lines. Butyrate-resistant cells are quite unaffected by treatment with deoxycholic acid but apoptosis is induced by chenodeoxycholic acid although to a lower extent than in butyrate-sensitive cells. These resistant cells are also less sensitive to lipopolysaccharide and show differences regarding the activation of ERK following osmotic stress. Thus, the cell model herein reported is a useful tool for investigating the molecular mechanisms of resistance to apoptosis, as well as to analyze specific targets for butyrate-resistant tumors.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Bile acids; Butyrate; Colon adenocarcinoma; Heat shock; Stress

## 1. Introduction

The crypt-villus axis of the intestinal mucosa is composed of a dynamic cell population that changes from proliferative undifferentiated crypt cells, to mature differentiated surface epithelial cells. Epithelial cell migration from the crypt base to the surface is accompanied by cellular differentiation, which is influenced by luminal components including several physiological and environmental stressors. Among them, butyrate is a major player in the regulation of these processes and induces apoptotic cell death, promoting in this way the physiological turnover of the mucosa (Andoh

et al., 2003; Miller, 2004; Scheppach and Weiler, 2004). Colon cells may transiently survive the cytotoxic effects of these luminal stressors by triggering different molecular responses, such as the induction of the expression of heat-shock proteins (HSPs). Acquisition of resistance to apoptosis by tumor cells allows the accumulation of DNA damage that may lead to malignant transformation constituting a major obstacle for cancer therapy (Rupnarain et al., 2004).

We have previously established a butyrate-resistant tumorigenic human colon adenocarcinoma cell line (BCS-TC2.BR2) from the non-tumorigenic butyrate-sensitive BCS-TC2 parental cells (López de Silanes et al., 2004). The analysis of the differences between gene expression profiles in BCS-TC2.BR2 and BCS-TC2 cells reveals alterations in several genes involved in resistance to apoptosis

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3944256; fax: +34 91 3944159.  
E-mail address: [lizarbe@bbm1.ucm.es](mailto:lizarbe@bbm1.ucm.es) (M.A. Lizarbe).

# Kinetic analysis of butyrate transport in human colon adenocarcinoma cells reveals two different carrier-mediated mechanisms

Emilio LECONA\*, Nieves OLMO\*, Javier TURNAY\*, Angélica SANTIAGO-GÓMEZ\*, Isabel LÓPEZ DE SILANES†, Myriam GOROSPE† and M. Antonia LIZARBE\*<sup>1</sup>

\*Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemistry, Complutense University, 28040 Madrid, Spain, and †Laboratory of Cellular and Molecular Biology, National Institute on Aging – Intramural Research Program, NIH (National Institutes of Health), Baltimore, MD 21224, U.S.A.

Butyrate has antitumorigenic effects on colon cancer cells, inhibits cell growth and promotes differentiation and apoptosis. These effects depend on its intracellular concentration, which is regulated by its transport. We have analysed butyrate uptake kinetics in human colon adenocarcinoma cells sensitive to the apoptotic effects of butyrate (BCS-TC2, Caco-2 and HT-29), in butyrate-resistant cells (BCS-TC2.BR2) and in normal colonic cells (FHC). The properties of transport were analysed with structural analogues, specific inhibitors and different bicarbonate and sodium concentrations. Two carrier-mediated mechanisms were detected: a low-affinity/high-capacity ( $K_m = 109 \pm 16$  mM in BCS-TC2 cells) anion exchanger and a high-affinity/low-capacity ( $K_m = 17.9 \pm 4.0$   $\mu$ M in BCS-TC2 cells) proton-monocarboxylate co-transporter that was energy-dependent and activated via PKC $\delta$  (protein kinase C $\delta$ ). All adenocarcinoma cells analysed express MCT (monocarboxylate transporter) 1, MCT4, ancillary protein CD147 and AE2 (anion exchanger 2). Silencing experiments show that MCT1, whose expression increases with

butyrate treatment in butyrate-sensitive cells, plays a key role in high-affinity transport. Low-affinity uptake was mediated by a butyrate/bicarbonate antiporter along with a possible contribution of AE2 and MCT4. Butyrate treatment increased uptake in a time- and dose-dependent manner in butyrate-sensitive but not in butyrate-resistant cells. The two butyrate-uptake activities in human colon adenocarcinoma cells enable butyrate transport at different physiological conditions to maintain cell functionality. The high-affinity/low-capacity transport functions under low butyrate concentrations and may be relevant for the survival of carcinoma cells in tumour regions with low glucose and butyrate availability as well as for the normal physiology of colonocytes.

**Key words:** anion exchanger, butyrate uptake, colon adenocarcinoma, monocarboxylate transporter, protein kinase C (PKC) activator, small interfering RNA (siRNA).

## INTRODUCTION

SCFAs (short-chain fatty acids) are produced by anaerobic bacterial fermentation of dietary fibre within the large bowel. Among them, butyrate plays a key role in colonic epithelium homeostasis and represents the main fuel for colonocytes *in vivo*. Butyrate induces cell differentiation and apoptosis and regulates proliferation of mucosal epithelial cells, reducing the growth rate of colorectal cancer cells in culture [1,2]. It is currently accepted that butyrate effects are mainly due to the regulation of the expression of specific genes through its activity as histone deacetylase inhibitor [3]. SCFA uptake can be rate limiting, and deficiencies in the availability or utilization of butyrate have been implicated in the development of colitis and in colon carcinogenesis [4].

Different studies using several model systems indicate that SCFAs are transported into colonic epithelial cells by two different mechanisms: passive non-ionic diffusion (unspecific component) of the undissociated SCFA form and specific carrier-mediated transport of SCFA anions. Although butyrate should be ionized at the physiological pH of the colonic lumen, the non-ionic form of butyrate can exist due to the luminal acidic microclimate generated in the apical region of colonocytes by H<sup>+</sup>-secreting systems, as the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (isoforms 2 and 3) [5]. Earlier work suggests that this is the main uptake mechanism [6], but

later evidence supports a greater participation of carrier-mediated transport [7].

Carrier-mediated transport of the ionized form of butyrate has been described so far as: (i) a non-electrogenic SCFA<sup>−</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>−</sup> antiporter, (ii) an electroneutral H<sup>+</sup>-coupled MCT (monocarboxylate transporter) and (iii) an electrogenic Na<sup>+</sup>-coupled transporter for monocarboxylates. The SLC (solute carrier family) 4 family mediates Na<sup>+</sup>-independent anion exchange and is involved in the electroneutral and reversible exchange of Cl<sup>−</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>−</sup> across the plasma membrane. The AE2 (anion exchanger 2) isoform [SLC4A2 (SLC4 member 2)] has been described to mediate apical butyrate transport in HEK-293 cells (human embryonic kidney cells) [8]. Experiments with membrane vesicles show a butyrate–HCO<sub>3</sub><sup>−</sup> exchange in apical and basolateral membranes from surface cells, but not from crypt cells, that is stimulated by a pH gradient [9,10].

The proton-linked monocarboxylate transport is carried out by members of the SLC16 family. MCT1 (SLC16A1) and MCT4 (SLC16A3) require a monotopic ancillary protein, CD147, for proper cell surface expression and butyrate transport. MCTs may transport one monocarboxylate with either a proton or sodium [11,12], or exchange one monocarboxylate for another, via electroneutral transport, with a 1:1 stoichiometry. Monocarboxylate flux direction depends on the chemical gradients for H<sup>+</sup> and monocarboxylates across the membrane. Heterologous

Abbreviations used: AE, anion exchanger; BSM, bisindolylmaleimide I; 4-CHC,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate; DIDS, 4,4'-di-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate; HBSS, Hanks balanced salt solution; MCT, monocarboxylate transporter; PKC, protein kinase C; SCFA, short-chain fatty acid; siRNA, small interfering RNA; SLC4, solute carrier family; SLC4A2 etc.), SLC4 member 2 (etc.); RT, reverse transcriptase.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email lizarbe@bbm1.ucm.es).

# Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells

Juan Ignacio Barrasa · Nieves Olmo ·  
Pablo Pérez-Ramos · Angélica Santiago-Gómez ·  
Emilio Lecona · Javier Turnay · M. Antonia Lizarbe

Published online: 23 July 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** The continuous exposure of the colonic epithelium to high concentrations of bile acids may exert cytotoxic effects and has been related to pathogenesis of colon cancer. A better knowledge of the mechanisms by which bile acids induce toxicity is still required and may be useful for the development of new therapeutic strategies. We have studied the effect of deoxycholic acid (DCA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) treatments in BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells. Both bile acids promote cell death, being this effect higher for CDCA. Apoptosis is detected after 30 min–2 h of treatment, as observed by cell detachment, loss of membrane asymmetry, internucleosomal DNA degradation, appearance of mitochondrial transition permeability (MPT), and caspase and Bax activation. At longer treatment times, apoptosis is followed in vitro by secondary necrosis due to impaired mitochondrial activity and ATP depletion. Bile acid-induced apoptosis is a result of oxidative stress with increased ROS generation mainly by activation of plasma membrane enzymes, such as NAD(P)H oxidases and, to a lower extent, PLA<sub>2</sub>. These effects lead to a loss of mitochondrial potential and release of pro-apoptotic factors to the cytosol, which is confirmed by activation of caspase-9 and -3, but not caspase-8. This initial apoptotic steps promote cleavage of Bcl-2, allowing Bax activation and formation of additional pores in the mitochondrial membrane that amplify the apoptotic signal.

**Keywords** Apoptosis · Bile acids · Caspases · Colon adenocarcinoma · Reactive oxygen species

## Abbreviations

CA	Cholic acid (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid)
CDCA	Chenodeoxycholic acid (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid)
DCA	Deoxycholic acid (3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid)
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
DPI	Diphenyleneiodonium
LCA	Lithocholic acid (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholanolic acid)
LDH	Lactate dehydrogenase
MPT	Mitochondrial transition permeability
NAC	N-acetyl-cysteine
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
ROS	Reactive oxygen species
UDCA	Ursodeoxycholic acid (3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid)

## Introduction

Bile acids are natural detergents that allow lipids to be digested in the intestinal lumen and play a major role in the maintenance of bile flow and intestinal homeostasis. The primary bile acids, cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA), are synthesized and conjugated with glycine and taurine in the liver, stored in the gall bladder and then released into the intestinal tract [1]. Most of these bile acids are reabsorbed at the distal small intestine via the

J. I. Barrasa · N. Olmo · P. Pérez-Ramos ·  
A. Santiago-Gómez · E. Lecona · J. Turnay ·  
M. Antonia Lizarbe (✉)  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I,  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense,  
28040 Madrid, Spain  
e-mail: lizarbe@bbm1.ucm.es



# Histone deacetylase inhibitors upregulate *MMP11* gene expression through Sp1/Smad complexes in human colon adenocarcinoma cells

Juan I. Barrasa<sup>a</sup>, Nieves Olmo<sup>a</sup>, Angélica Santiago-Gómez<sup>a</sup>, Emilio Lecona<sup>a</sup>, Patrick Anglard<sup>b</sup>, Javier Turnay<sup>a</sup>, M. Antonia Lizarbe<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemistry; Complutense University, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC), Université de Strasbourg, CNRS, UMR 7237, 67000 Strasbourg, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 4 July 2011

Received in revised form 25 November 2011

Accepted 20 December 2011

Available online 29 December 2011

### Keywords:

Butyrate

Colon adenocarcinoma

Histone-deacetylase inhibitor

MAP kinase

Metalloproteinase

## ABSTRACT

MMP-11 (stromelysin-3) is a matrix metalloproteinase associated with tumor progression and poor prognosis. Its expression was initially described exclusively in stromal cells surrounding tumors, but more recently it has also been detected in macrophages and hepatocarcinoma cells. Here we show MMP-11 expression in human epithelial colon adenocarcinoma cell lines (Caco-2, HT-29 and BCS-TC2). Treatment of BCS-TC2 cells with butyrate and trichostatin A (TSA) (histone deacetylase inhibitors) increases *MMP11* promoter activity and protein expression. Using electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and supershift assays, we demonstrate for the first time that Sp1 is able to bind to the GC-boxes within the *MMP11* proximal promoter region; this binding has been confirmed by chromatin immunoprecipitation. Sp1 is involved in *MMP11* basal expression and it is essential for the upregulation of transcription by histone deacetylase inhibitors as deduced from mutant constructs lacking the Sp1 sites and by inhibition of its binding to the promoter with mithramycin. This regulation requires the formation of Sp1/Smad2 heterocomplexes, which is stimulated by an increase in the acetylation status of Smad after butyrate or TSA treatments. We have also found that ERK1/2-mitogen-activated protein kinase (MAPK), but not p38-MAPK or JNK, is involved in the upregulation of *MMP11* by HDAC inhibitors.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a well conserved family of zinc-dependent endopeptidases involved in the degradation of the extracellular matrix during remodeling processes of both normal and pathological tissues, such as embryogenic development, wound healing, inflammation, angiogenesis or tumor progression [1]. The members of this family have a conserved catalytic domain, a signal peptide which directs the secretion process and a propeptide region to maintain enzyme latency. The majority of MMPs have a hemopexin-like domain that is responsible for the substrate specificity and for the interaction with endogenous inhibitors (TIMPs, tissue inhibitor of metalloproteinases) [1,2]. MMPs are either secreted or anchored to the cell membrane, where they exert their catalytic activity over substrates within the pericellular space.

The expression and activation of MMPs are tightly regulated. The activity of MMPs is controlled at several levels to ensure that their degradative functions are confined to those places or situations

where it is necessary. The MMPs are expressed as inactive proenzymes that require the removal of the propeptide region to switch on their protease activity. Alternatively, MMP-11, MMP-23, MMP-28 and membrane-type MMPs can be activated intracellularly by furin-like serine proteases and then either secreted or bound to the cell surface [3]. MMPs are strongly regulated by tissue specific location or by inactivation by TIMPs [2].

Human MMP-11, also known as stromelysin-3, differs drastically from other MMPs in its catalytic targets:  $\beta$ -casein, insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1),  $\alpha$ 2-macroglobulin, serine proteinase inhibitors (such as  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor,  $\alpha$ 1PI, and  $\alpha$ 2-antiplasmin), the laminin receptor and type VI collagen [4]. In addition to substrate specificity and proteolytic activation, MMP-11 differs from other MMPs in its transcriptional regulation [5,6]. Its expression is stimulated by retinoic acid through a retinoic acid-response element (RARE) located in its proximal promoter in which there is no AP-1 site [7].

MMP-11 was first described in stromal cells surrounding breast neoplastic cells [8] and was later detected in the stroma of other tumors, such as non-small cell lung cancer [9,10] or colorectal carcinomas [11], as well as in macrophages [12], and in Hca-F mouse hepatocarcinoma cells [13]. High levels of MMP-11 protein and mRNA have been correlated with a poor prognosis in carcinomas; in addition, it has been described as a predictive tumor biomarker in

Abbreviations: HDAC, histone deacetylase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; TSA, trichostatin A.

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4256; fax: +34 91 394 4159.

E-mail address: [lizarbe@bbm1.ucm.es](mailto:lizarbe@bbm1.ucm.es) (M.A. Lizarbe).